

**Phänotypische und funktionelle Charakterisierung
der Zink-Metalloprotease ProA von
*Legionella pneumophila***

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig



zur Erlangung des Grades
einer Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Stefanie Thiem
aus Wolfsburg

1. Referent:	Prof. Dr. Michael Steinert
2. Referentin:	Prof. Dr. Petra Dersch
eingereicht am:	29.10.2018
mündliche Prüfung (Disputation) am:	29.01.2019
Druckjahr:	2019

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Kuhn, P., **Thiem, S.**, Steinert, M., Purvis, D., Lugmayr, V., Treutlein, U., Plobner, L., Leiser, R.-M., Hust, M., Dübel, S. Human Anti-Lipopolysaccharide (LPS) antibodies against *Legionella* with high species specificity. Hum. Antibodies Jul 19;26(1):29-38 (2017).

Hoppe, J., Ünal, C. M., **Thiem, S.**, Grimpe, L., Goldmann, T., Gaßler, N., Richter, M., Shevchuk, O., Steinert, M. PilY1 promotes *Legionella pneumophila* infection of human lung tissue explants and contributes to bacterial adhesion, host cell invasion and twitching motility. Front. Cell. Infect. Microbiol. Mar 7;7:63 (2017).

Rasch, J., **Krüger, S.**, Fontvieille, D., Ünal, C. M., Michel, R., Labrosse, A., Steinert, M. *Legionella*-protozoa-nematode interactions in aquatic biofilms and influence of Mip on *Caenorhabditis elegans* colonization. Int. J. Med. Microbiol. Sep;306(6):443-51 (2016).

Tagungsbeiträge

Krüger, S., Groenewold, M., Schinner, S., Lung Pathogens: think big, because they do. (Vortrag) 7. Public Retreat der Helmholtz International Graduate School for Infection Research, Hahnenklee (2016).

Krüger, S., Zegenhagen, L., Groenewold, M., Attack and defense – all against one. (Vortrag) 6. Public Retreat der Helmholtz International Graduate School for Infection Research, Braunschweig (2015).

Krüger, S. Role of ProA in *ex vivo* infection of human lung tissue explants. (Vortrag) HZI-Symposium: *Legionella* SPP. – From molecular biology to ecology of waterborne pathogens most relevant in developed countries, Braunschweig (2014).

Posterbeiträge

Thiem, S., Tiefenau, J., Jäger, J., Marwitz, S., Kugler, C., Goldmann, T., Steinert, M. The *Legionella pneumophila* protease ProA causes severe damage in human lung tissue explants. 69. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Würzburg (2017).

Thiem, S., Tiefenau, J., Jäger, J., Marwitz, S., Kugler, C., Goldmann, T., Steinert, M. The zinc metalloprotease ProA contributes to the extracellular pathogenicity of *Legionella pneumophila*. 9. PhD-Symposium des Helmholtz-Zentrums für Infektionsforschung, Braunschweig (2016).

Thiem, S., Tiefenau, J., Jäger, J., Marwitz, S., Kugler, C., Goldmann, T., Steinert, M. The zinc metalloprotease ProA contributes to the extracellular pathogenicity of *Legionella pneumophila*. International Symposium on *Legionella* – Ecology, Virulence and Risk Assessment, Braunschweig (2016).

Krüger, S., Tiefenau, J., Jäger, J., Marwitz, S., Kugler, C., Goldmann, T., Steinert, M. The zinc metalloprotease ProA of *Legionella pneumophila* and its effects in human lung tissue infections. 8. PhD-Symposium des Helmholtz-Zentrums für Infektionsforschung, Braunschweig (2015).

Krüger, S., Tiefenau, J., Jäger, J., Marwitz, S., Kugler, C., Goldmann, T., Steinert, M. The zinc metalloprotease ProA of *Legionella pneumophila* and its effects in human lung tissue infections. 67. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Münster (2015).

Krüger, S., Schmelz, S., Steinert, M. Analysis of the virulence factor ProA from *Legionella pneumophila*. 7. PhD-Symposium des Helmholtz-Zentrums für Infektionsforschung, Braunschweig (2014).

Krüger, S., Schmelz, S., Steinert, M. Analysis of the virulence factor ProA from *Legionella pneumophila*. 66. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Dresden (2014).

Krüger, S., Schmelz, S., Steinert, M. Analysis of the virulence factor ProA from *Legionella pneumophila*. 5. Public Retreat der Helmholtz International Graduate School for Infection Research, Braunschweig (2014).

*Wege entstehen dadurch,
dass man sie geht.*

Franz Kafka

Danksagungen

Mein erster Dank gilt **Prof. Dr. Michael Steinert** für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen und die jahrelange erfolgreiche Zusammenarbeit. Vielen Dank für das spannende und vielseitige Thema, die Motivation und Anregungen, die wissenschaftliche Freiheit und die stetige Unterstützung.

Weiterhin danke ich **Prof. Dr. Petra Dersch** und **Prof. Dr. Michael Hust** für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens und des Prüfungsvorsitzes.

Prof. DDr. Gottfried Brem von der Veterinärmedizinischen Universität Wien danke ich für die Unterstützung dieser Arbeit im Rahmen des EUROSTARS-Projekts „APT-DETECT“. Auch bei der **Helmholtz International Graduate School for Infection Research** bedanke ich mich für die Förderung.

Bei **Dr. Ansgar Dellmann** vom Städtischen Klinikum Braunschweig sowie **Prof. Dr. Torsten Goldmann** und **Dr. Sebastian Marwitz** vom Forschungszentrum Borstel bedanke ich mich für die erfolgreiche Zusammenarbeit im Bereich HLTE-Infektionen. Weiterhin danke ich **Prof. Dr. Nikolaus Gaßler**, **Prof. Dr. René Brouwer**, **Dr. Matthias Richter** und **Dr. Johannes Haag** für die Bereitstellung des Lungengewebes.

Weiterhin möchte ich mich bei **Prof. Dr. Wulf Blankenfeldt**, **Dr. Konrad Büssow**, **Dr. Stefan Schmelz** und **Dr. Mihai Gazdag** vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung für die Zusammenarbeit in den Bereichen Proteinexpression und Kristallisation bedanken.

Prof. Dr. Susanne Engelmann und **Dr. Martin Kucklick** danke ich für die Möglichkeit, die Sekretomanalysen in ihren Laboren anfertigen zu können und für die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Prof. Dr. Stefan Dübel, **Prof. Dr. Michael Hust** und **Dr. Philipp Kuhn** danke ich für die Bereitstellung des spezifischen anti-ProA-Antikörpers und die gute Zusammenarbeit.

Bei **Prof. Dr. Susanne Häußler** und **Prof. Dr. Wulf Blankenfeldt** bedanke ich mich für die Beratung und nützlichen Tipps im Rahmen des Thesis Committees.

Meinem Bachelorstudenten **Hendrik Schürer** danke ich für die tolle Zusammenarbeit, den unermüdlichen Klonierungseinsatz und die schöne gemeinsame Zeit im Labor.

Bei meiner Masterstudentin und würdigen ProA-Erbin **Lina Scheithauer** möchte ich mich ganz herzlich für die produktive Zusammenarbeit (im wahrsten Sinne des Wortes), die schöne Zeit innerhalb und außerhalb des Labors, die Begeisterung an dem Thema und die vielen tollen Ideen bedanken. Du hast unserer Lieblingsprotease noch einmal ganz neues Leben eingehaucht und ich bin gespannt auf viele weitere tolle Ergebnisse.

Ein besonderer Dank gilt meiner Labor- und Büronachbarin, Masterbetreuerin und langjährigen Freundin **Janine Rasch**. Vielen Dank für eine schöne, lustige und verrückte Zeit innerhalb und außerhalb des Labors, die mitreißende Begeisterung und vielen tollen Ideen, die Aufmunterung bei Tiefschlägen jeglicher Art und die lange, tolle Freundschaft.

Can Ünal, danke, dass Du Dein universelles Wissen mit mir geteilt hast, wann immer ich es gebraucht habe. Vielen Dank auch für das Korrekturlesen dieser Arbeit, Deine Hilfsbereitschaft, lustige und abenteuerliche Unternehmungen, den besten Apple Crumble der Welt und für die tolle Freundschaft.

Hannes Beims, vielen Dank für viele irrwitzige Gespräche und tiefgründige Überlegungen, für eine tolle Zeit innerhalb und außerhalb des Labors, schöne Cuxhaven-Urlaube und die tolle Freundschaft. Biene gut, alles gut.

Julia Hoppe, vielen Dank für eine schöne, gemeinsame Zeit, die Bereitstellung von Choco Moo in schweren Zeiten, die Gespräche über Gott und die Welt, Zalando-Eskalationen und unseren halbjährlichen Kaffeeklatsch.

Hilger Jagau, danke für die immerwährende Hilfsbereitschaft, die kreativen Ideen und den unermüdlichen Einsatz bei der Reparatur von Dingen jeglicher Art, wenn unsere Experimente mal wieder ausgefert sind.

Ganz besonders danke ich allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der **AG Steinert: Barbara, Simone, Qunxiu, Gabi, Aurélie, Jens, Jana, Olga, Freddi, Corina, Chris, Elena, Dennis und Dennis, Jessica, Katha-Ina, Louisa, Alina, Ümran, Stefan, Annemarie, Simon und natürlich allen Lisas**. Ihr habt alle irgendwo und irgendwie zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Danke für die tolle Arbeitsatmosphäre, die stetige Hilfsbereitschaft und die schöne gemeinsame Zeit. Mein Dank gilt auch

dem gesamten **Institut für Mikrobiologie**, insbesondere **Daniela, Louisa, Christina, Gunhild, Barbara und Dagmar**.

Ein großer Dank geht an meine Freunde **Jenny, Sabrina, Janine, Linda, Nancy, Matze, Sebastian, Martin, Ingo und Frie**. Ihr seid für mich wie eine zweite Familie und ohne euch würde ich heute nicht da stehen, wo ich bin. Danke für eure ständige Unterstützung in guten und in schlechten Zeiten und für den langen, von unvergesslichen Momenten geprägten Weg, den wir bis jetzt gemeinsam gehen durften.

Mein letzter und zugleich wichtigster Dank geht an meinen Mann **Sebastian** sowie meine Eltern **Margit** und **Andreas**. Ohne Euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Danke für Eure immerwährende Unterstützung, den Rückhalt, die unendliche Geduld und Motivation.

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
2 Summary	3
3 Einleitung	5
3.1 Legionellose und ihre Epidemiologie	5
3.2 Allgemeine Merkmale von <i>L. pneumophila</i>	7
3.3 Lebensraum, Wirte und Übertragung auf den Menschen	8
3.4 Intrazellulärer Lebenszyklus	10
3.5 Virulenzfaktoren	12
3.5.1 Sekretionssysteme	13
3.5.2 Die äußere Membran und Außenmembranvesikel	14
3.5.3 Adhärenz-relevante Virulenzfaktoren	15
3.5.4 Mip und Eisenaufnahme	16
3.5.5 Regulatoren	18
3.6 Proteolytische Virulenzfaktoren	19
3.6.1 Mikrobielle Metalloproteasen	19
3.6.2 Metalloproteasen von <i>L. pneumophila</i>	24
3.6.3 Die Zink-Metalloprotease ProA	26
3.7 Die Flagelle von <i>L. pneumophila</i>	29
3.7.1 Allgemeiner Aufbau	30
3.7.2 Regulation	32
3.7.3 Rolle in der Virulenz von <i>L. pneumophila</i>	33
3.7.4 Das FlaA-Protein von <i>L. pneumophila</i>	35
3.8 Wechselwirkung von <i>L. pneumophila</i> mit der angeborenen Immunabwehr	36
3.8.1 <i>Toll-like receptors</i>	36

Inhaltsverzeichnis

3.8.2	<i>NOD-like receptors</i>	39
3.8.3	Das Asc-Inflammasom	40
3.8.4	<i>RIG-I-like receptors</i>	41
3.9	Zielsetzung der Arbeit	42
4	Material und Methoden	43
4.1	Geräte	43
4.2	Verbrauchsmaterialien	45
4.3	Zellen, Bakterienstämme, Antikörper, Enzyme, Oligonukleotide, kommerzielle Kits, Vektoren, Software und Datenbanken	46
4.4	Bakteriologische Methoden	54
4.4.1	Kultivierung von Bakterien	54
4.4.2	Kryokonservierung von Bakterien	58
4.4.3	Bestimmung der Zelldichte	59
4.4.4	Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen mit RbCl	59
4.4.5	Wachstumsversuche in YEB	60
4.4.6	Wachstumsversuche in CDM	61
4.4.7	<i>Sliding Motility</i>	61
4.4.8	Wachstum in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid	61
4.4.9	<i>Stationary Phase Survival</i>	62
4.4.10	Wachstum in Anwesenheit von Phytat	62
4.4.11	Isolierung der Flagelle von <i>L. pneumophila</i>	63
4.5	Zellbiologische Methoden	64
4.5.1	Kultivierung von <i>Acanthamoeba castellanii</i>	64
4.5.2	Kultivierung von <i>Vermamoeba vermiformis</i>	65
4.5.3	Kultivierung von THP-1-Makrophagen	67
4.5.4	Kultivierung von HEK-Blue™ hTLR5-Zellen	69
4.6	Infektionsbiologische Methoden	70
4.6.1	Infektionsversuche mit <i>A. castellanii</i> und <i>V. vermiformis</i>	71
4.6.2	Infektionsversuche mit THP-1-Zellen	72
4.6.3	Infektionsversuche mit humanen Lungengewebsexplantaten	73
4.7	Molekularbiologische Methoden	75
4.7.1	Isolation genomischer DNA	75
4.7.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	76
4.7.3	Agarosegelelektrophorese	76

4.7.4	Herstellung von <i>L. pneumophila</i> Deletionskonstrukten	77
4.7.5	Transformation von chemisch-kompetenten <i>E. coli</i>	84
4.7.6	Herstellung von <i>L. pneumophila</i> Deletionsmutanten	84
4.7.7	Sequenzierung	85
4.7.8	Klonierung von <i>L. pneumophila</i> -Genen für die rekombinante Proteinproduktion	85
4.8	Proteinbiochemische Methoden	87
4.8.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	87
4.8.2	Bestimmung der Proteaseaktivität	87
4.8.3	Konzentrierung von Proteinen mittels Amicon® Zentrifugal- Filtereinheiten	88
4.8.4	Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese	88
4.8.5	Coomassie Silver-Blue Färbung	90
4.8.6	Färbung mit InstantBlue™	91
4.8.7	Silberfärbung	91
4.8.8	Western Blot und Immunfärbung	92
4.8.9	Isolierung von ProA aus <i>L. pneumophila</i>	93
4.8.10	Produktion und Reinigung von rekombinantem ProA	96
4.8.11	Kristallisation von ProA	102
4.8.12	Isolierung des Sekretoms mittels TCA-Fällung	103
4.8.13	2D-Gelelektrophorese	104
4.8.14	Identifikation von Proteinen via Massenspektrometrie	105
4.8.15	Messung der CXCL8-Konzentration mittels ELISA	108
5	Ergebnisse	109
5.1	Optimierung von Produktion und Reinigung der Zink-Metalloprotease ProA	109
5.1.1	Isolierung von nativem ProA aus <i>L. pneumophila</i>	110
5.1.2	Produktion und Reinigung von rekombinantem ProA	112
5.1.3	Affinitätschromatographie mit Protino® Ni-TED Tropfsäulen	113
5.1.4	Affinitätschromatographie mit FPLC	114
5.1.5	Hydrophobe Interaktionschromatographie	116
5.1.6	Gelpermeationschromatographie	117
5.1.7	Kristallisation von ProA	119
5.2	Einfluss von ProA auf das Wachstumsverhalten und das Sekretom	121

Inhaltsverzeichnis

5.2.1	Erstellung einer <i>proA</i> -Deletionsmutante	122
5.2.2	ProA hat keinen Einfluss auf das Wachstum in YEB	124
5.2.3	ProA hat einen Einfluss auf das Wachstum in CDM	127
5.2.4	ProA beeinflusst das Sekretomprofil in YEB	130
5.2.5	Im Sekretom der <i>proA</i> -Deletionsmutante sind zahlreiche Proteine dezimiert	133
5.2.6	ProA hat keinen Einfluss auf das Sekretomprofil in CDM	141
5.3	Phänotypische Untersuchung der <i>proA</i> -Deletionsmutante in Bezug auf das veränderte Sekretom	144
5.3.1	ProA hat keinen Einfluss auf das Wachstum in Anwesenheit von H ₂ O ₂	145
5.3.2	ProA beeinflusst das <i>Stationary Phase Survival</i>	148
5.3.3	ProA beeinflusst das Wachstum in Anwesenheit von Phytat	150
5.3.4	ProA beeinflusst die intrazelluläre Replikation in <i>A. castellanii</i> in Anwesenheit von Phytat	151
5.4	Phänotypische Charakterisierung von Protease-Deletionsmutanten	153
5.4.1	Erstellung einer <i>lpc_0267</i> -Deletionsmutante	153
5.4.2	Erstellung einer <i>pepN</i> -Deletionsmutante	155
5.4.3	ProA und PepN beeinflussen die <i>Sliding Motility</i> von <i>L. pneumophila</i>	157
5.4.4	ProA beeinflusst die intrazelluläre Replikation in <i>A. castellanii</i> in der frühen Vermehrungsphase	161
5.4.5	ProA beeinflusst die intrazelluläre Replikation in <i>V. vermiformis</i> in der frühen Vermehrungsphase	163
5.4.6	ProA beeinflusst die intrazelluläre Replikation in THP-1	165
5.4.7	ProA beeinflusst die intrazelluläre Replikation in HLTEs	167
5.4.8	ProA verursacht eine massive Gewebeschädigung während der HLTE-Infektion	169
5.5	Einfluss von ProA auf die Wirts-Immunantwort	172
5.5.1	Isolierung von FlaA aus <i>L. pneumophila</i>	172
5.5.2	ProA degradiert monomeres Flagellin	173
5.5.3	ProA verhindert die TLR5-Aktivierung durch FlaA	175
5.5.4	Die <i>proA</i> -Deletionsmutante induziert eine erhöhte Aktivierung von TLR5	177

5.5.5	ProA reduziert die Aktivierung von TLR5 während der HLTE-Infektion	180
5.5.6	ProA verhindert die CXCL8-Produktion in HLTEs	181
6	Diskussion	185
6.1	Optimierung von Produktion und Reinigung von ProA sowie erste Versuche zur Kristallisation	185
6.2	Einfluss von ProA auf das Wachstumsverhalten und das Sekretom . .	190
6.3	ProA und PepN beeinflussen die <i>Sliding Motility</i>	197
6.4	ProA beeinflusst die intrazelluläre Replikation	200
6.5	ProA ist wichtig für die Infektion von humanem Lungengewebe . . .	205
6.6	ProA verhindert die Flagellin-vermittelte Immundetektion	211
6.7	Ausblick	217
7	Literaturverzeichnis	221
8	Anhang	263
8.1	Abkürzungsverzeichnis	263
8.2	Zusatztabellen Sekretomanalyse	267
8.3	Alignment der <i>proA</i> -Deletionsmutante (1/2)	269
8.4	Alignment der <i>proA</i> -Deletionsmutante (2/2)	281
8.5	Alignment der <i>dotA</i> -Deletionsmutante	291
8.6	Alignment der <i>lpc_0267</i> -Deletionsmutante	301

Abbildungsverzeichnis

3.1	Elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>L. pneumophila</i>	8
3.2	Elektronenmikroskopische Aufnahme von mit <i>L. pneumophila</i> infizierten Wirtszellen	9
3.3	Intrazellulärer Lebenszyklus von <i>L. pneumophila</i>	11
3.4	Übersicht über die Familie der Zink-Metalloproteasen	21
3.5	Schematische Darstellung der inaktiven Vorstufen verschiedener M4-Proteasen	23
3.6	LasB-basiertes Modell der ProA-Struktur und des aktiven Zentrums .	27
3.7	Lokalisierung von ProA in <i>L. pneumophila</i> -infizierten Makrophagen .	29
3.8	Schematische Darstellung des Flagellums Gram-negativer Bakterien .	31
3.9	Postuliertes Flagellen-Regulon von <i>L. pneumophila</i>	33
3.10	Schematische Darstellung der Erkennung von <i>L. pneumophila</i> durch das angeborene Immunsystem	37
4.1	Verwendete DNA- und Protein-Größenstandards	51
4.2	Vektorkarten	54
4.3	Schema zur Herstellung eines Deletionskonstrukts mittels Joining-PCR	79
4.4	Schema zur Herstellung eines Deletionskonstrukts durch Einfügen von Restriktionsschnittstellen	82
4.5	Schema der Proteinauftrennung durch Anionenaustauschchromatographie	95
4.6	Schema der Proteinauftrennung mittels Nickel-Chelat-Chromatographie	97
4.7	Schema der Proteinauftrennung durch hydrophobe Interaktionschromatographie	100
4.8	Schema der Auftrennung mittels Gelfiltrationschromatographie	102
4.9	Schematische Darstellung der <i>Sitting-Drop</i> -Kristallisation	103
5.1	SDS-Gelanalyse der Reinigung von nativem ProA	111

Abbildungsverzeichnis

5.2	Bestimmung der konzentrationsabhängigen Proteaseaktivität von nativem ProA	112
5.3	Reinigung von rekombinantem ProA mittels Protino® Ni-TED-Säule .	113
5.4	Reinigung von rekombinantem ProA über Affinitätschromatographie mittels FPLC	115
5.5	Reinigung von rekombinantem ProA mittels hydrophober Interaktionschromatographie	117
5.6	Reinigung von rekombinantem ProA mittels Gelpermeationschromatographie	118
5.7	Kristallisation von rekombinantem ProA unter verschiedenen Bedingungen	120
5.8	Agarosegele der <i>proA</i> -flankierenden Regionen, der Kanamycinkassette und des Deletionskonstrukts	122
5.9	Agarosegelelektrophorese der Kolonie-PCR von <i>L. pneumophila</i> Corby $\Delta proA$	123
5.10	Wachstumsverhalten in YEB-Medium	124
5.11	Proteinkonzentration und Proteaseaktivität von <i>L. pneumophila</i> -YEB-Kulturüberständen	126
5.12	Wachstumsverhalten in chemisch-definiertem Medium	127
5.13	Proteinkonzentration und Proteaseaktivität von <i>L. pneumophila</i> -CDM-Kulturüberständen	129
5.14	SDS-PAGE der Sekretome des Wildtyps und der <i>proA</i> -defizienten Mutante in YEB	131
5.15	2D-Gelelektrophorese der Sekretome von <i>L. pneumophila</i> Corby WT und <i>L. pneumophila</i> Corby $\Delta proA$ in YEB	132
5.16	Postulierte Funktionen der im Sekretom der <i>proA</i> -Deletionsmutante dezimierten sowie nur im Wildtyp-Sekretom vorkommenden Proteine	139
5.17	Bestimmung der koloniebildenden Einheiten vor und nach der Zentrifugation	140
5.18	Vergleich der Proteinprofile des Wildtyps und der <i>proA</i> -defizienten Mutante in CDM	142
5.19	Einfluss von unterschiedlichen Proteinquellen und Ca^{2+} -Defizienz auf die Produktion von ProA in CDM	143

5.20	Wachstum von <i>L. pneumophila</i> Corby WT und <i>L. pneumophila</i> Corby $\Delta proA$ auf BCYE-Agar mit H ₂ O ₂	146
5.21	Wachstum von <i>L. pneumophila</i> Corby WT und <i>L. pneumophila</i> Corby $\Delta proA$ in YEB in Anwesenheit von H ₂ O ₂	147
5.22	<i>Stationary Phase Survival</i> von <i>L. pneumophila</i> in YEB-Medium	149
5.23	Wachstum von <i>L. pneumophila</i> Corby WT und <i>L. pneumophila</i> Corby $\Delta proA$ in Anwesenheit von Phytat	151
5.24	Infektion von <i>A. castellanii</i> in Anwesenheit von Phytat	152
5.25	Agarosegelelektrophorese der <i>lpc_0267</i> -flankierenden Regionen, der Joining-PCR und des Deletionskonstrukts	154
5.26	Agarosegelelektrophorese von <i>pepN</i> mit flankierenden Regionen, der inversen PCR, der Gentamicinkassette und des Deletionskonstrukts	156
5.27	Kolonieausbreitung durch <i>Sliding Motility</i> bei Proteasemutanten von <i>L. pneumophila</i>	158
5.28	Ausbreitung des Tensidfilms bei Proteasemutanten von <i>L. pneumophila</i>	160
5.29	Intrazelluläre Replikation verschiedener <i>L. pneumophila</i> Corby Proteasemutanten in <i>A. castellanii</i>	162
5.30	Intrazelluläre Replikation verschiedener <i>L. pneumophila</i> Corby Proteasemutanten in <i>V. vermiformis</i>	164
5.31	Intrazelluläre Replikation verschiedener <i>L. pneumophila</i> Corby Proteasemutanten in THP-1-Makrophagen	166
5.32	Replikation verschiedener <i>L. pneumophila</i> Corby Proteasemutanten in HLTEs	168
5.33	Gewebschädigung in HLTEs durch Infektion mit <i>L. pneumophila</i> Corby	170
5.34	Isolierung von FlaA aus <i>L. pneumophila</i> Corby	173
5.35	Degradation von Flagellin durch ProA	174
5.36	hTLR5-Aktivierung in HEK-Blue™-Zellen bei Inkubation mit FlaA und ProA	176
5.37	Aktivierung von hTLR5 in HEK-Blue™-Zellen bei Inkubation mit <i>L. pneumophila</i> Corby	177
5.38	Konzentrationsabhängige hTLR5-Aktivierung in HEK-Blue™-Zellen bei Inkubation mit <i>L. pneumophila</i> Corby	179
5.39	hTLR5-Aktivierung in HEK-Blue™-Zellen durch HLTE-Überstände	181

Abbildungsverzeichnis

5.40	Bestimmung der CXCL8-Konzentration in <i>L. pneumophila</i> -infizierten HLTE-Überständen	182
6.1	Schema der ProA-Sekretion an Hand der Thermolysin-ähnlichen Proteasen	186
6.2	Mögliche Ziele von ProA während der Gewebedegradation in HLTEs	209
6.3	FlaA-vermittelte TLR5-Aktivierung und Immunantwort bei Infektion der humanen Lunge durch <i>L. pneumophila</i>	215
6.4	Modell zur Vermeidung der TLR5-vermittelten Immunantwort durch ProA	216

Tabellenverzeichnis

4.1	Verwendete Geräte	43
4.2	Spezielle Verbrauchsmaterialien	45
4.3	Antibiotika	46
4.4	Verwendete Zelllinien	46
4.5	Verwendete Bakterienstämme	47
4.6	Verwendete Oligonukleotide	48
4.7	Verwendete Restriktionsenzyme	50
4.8	Verwendete Antikörper	51
4.9	Vektoren	52
4.10	Kommerzielle Kits	52
4.11	Software und Datenbanken	53
4.12	Zusammensetzung <i>Buffered Charcoal Yeast Extract</i> (BCYE)-Agar . .	55
4.13	Zusammensetzung <i>Yeast Extract Broth</i> (YEB)-Flüssigmedium	55
4.14	Zusammensetzung chemisch definiertes Medium (CDM)	56
4.15	Zusammensetzung 10 x Aminosäure-Stocklösung	56
4.16	Zusammensetzung 10 x ANQG-Stocklösung	57
4.17	Zusammensetzung 10 x Salze-Stocklösung	57
4.18	Zusammensetzung 100 x Tyrosin-Stocklösung	57
4.19	Zusammensetzung „ <i>Lysogeny Broth</i> “-Flüssigmedium (LB)	57
4.20	Zusammensetzung „ <i>Terrific Broth</i> “-Flüssigmedium (TB)	58
4.21	Zusammensetzung 10 x PBS	58
4.22	Zusammensetzung TFB1-Puffer	59
4.23	Zusammensetzung TFB2-Puffer	60
4.24	Zusammensetzung PYG-Medium	64
4.25	Zusammensetzung Kryokonservierungsmedium für <i>A. castellanii</i> . . .	65
4.26	Zusammensetzung Pufferlösung	66
4.27	Zusammensetzung PYNFH-Medium	66

Tabellenverzeichnis

4.28	Zusammensetzung Kryokonservierungsmedium für <i>V. vermiformis</i> . .	67
4.29	Zusammensetzung Kryokonservierungsmedium für THP-1	68
4.30	Kryokonservierungsmedium für HEK-Blue™ hTLR5	69
4.31	Zusammensetzung Amöbenpuffer für <i>A. castellanii</i>	71
4.32	Zusammensetzung Assay-Medium für <i>V. vermiformis</i>	72
4.33	Zusammensetzung Puck's Saline F für <i>V. vermiformis</i>	72
4.34	Zusammensetzung Nährmedium für HLTEs	74
4.35	Lösungen für die DNA-Isolierung	75
4.36	Zusammensetzung 1 % Agarosegel	77
4.37	Zusammensetzung 50 x TAE-Lösung	77
4.38	Zusammensetzung 6 x DNA-Ladepuffer	77
4.39	Zusammensetzung Ethidiumbromid-Färbelösung	77
4.40	Zusammensetzung PCR-Ansatz mit Q5®-Polymerase	79
4.41	PCR-Programm Q5®-Polymerase	80
4.42	Zusammensetzung Ansatz A-Addition	80
4.43	Zusammensetzung Ligationsansatz	80
4.44	Zusammensetzung PCR-Ansatz mit <i>Taq</i> -Polymerase	81
4.45	PCR-Programm <i>Taq</i> -Polymerase	81
4.46	Restriktionsverdau pGEM®-T Easy mit flankierenden Regionen . . .	83
4.47	Zusammensetzung Restriktionsverdau Gentamicin-Kassette	83
4.48	Ligationsansatz pGEM®-T Easy mit Gentamicin-Kassette	83
4.49	Zusammensetzung Restriktionsverdau pET-22b(+)	86
4.50	Zusammensetzung Restriktionsverdau <i>proA</i> -Insert	86
4.51	Ligationsansatz für die rekombinante Proteinproduktion	86
4.52	Zusammensetzung 6 %-iges Sammelgel für die SDS-PAGE	89
4.53	Zusammensetzung 12 %-iges Trenngel für die SDS-PAGE	89
4.54	Zusammensetzung 10 x SDS-Laufpuffer	89
4.55	Zusammensetzung 4 x SDS-Ladepuffer	90
4.56	Zusammensetzung Coomassie Silver-Blue Färbelösung	90
4.57	Lösungen für die Silberfärbung	91
4.58	Lösungen für die Western Blot-Analyse	93
4.59	Lösungen für die Anionenaustauschchromatographie	96
4.60	Lösungen für die Affinitätschromatographie	98
4.61	Lösungen für die hydrophobe Interaktionschromatographie	100

4.62	Lösungen für die Gelfiltrationschromatographie	101
4.63	Zusammensetzung Rehydratisierungspuffer A	104
4.64	Lösungen für den In-Gel-Verdau	107
4.65	Lösungen für die Zip Tip-Entsalzung	108
4.66	Zusammensetzung Puffer A	108
5.1	Weitere getestete Expressionssysteme	109
5.2	Im Sekretom der <i>proA</i> -Deletionsmutante signifikant dezimierte Proteine	134
5.3	Proteine, die nur im Wildtyp-Sekretom identifiziert wurden	136
8.1	Abkürzungsverzeichnis	263
8.2	In 2 von 3 Sekretomen der <i>proA</i> -Deletionsmutante dezimierte Proteine	267
8.3	Proteine, die nur im Wildtyp-Sekretom (2 von 3) identifiziert wurden .	268

1 Zusammenfassung

Legionella pneumophila ist ein ubiquitär in der Umwelt vorkommendes Bakterium, das sich intrazellulär in Protozoen vermehrt. Über Aerosole aus schlecht gewarteten Wassersystemen kann *L. pneumophila* in die menschliche Lunge gelangen und sich dort in alveolaren Makrophagen sowie Lungenepithelzellen replizieren. Durch die Ausbreitung des Bakteriums in der Lunge kann es zu starken Schädigungen des pulmonalen Gewebes kommen, was oft in einer schweren, atypischen Lungenentzündung resultiert. Die sogenannte Legionärskrankheit kann in 15-20 % der Fälle tödlich verlaufen. Verantwortlich für die Pathogenität von *L. pneumophila* sind eine Vielzahl an Virulenzfaktoren.

Die Zink-Metalloprotease ProA ist das am meisten sezernierte Protein von *L. pneumophila* und weist Homologien zur Elastase LasB aus *P. aeruginosa* und Thermolysin aus *B. thermoproteolyticus* auf. Eine Aufschlüsselung der Kristallstruktur von ProA erfolgte jedoch bis dato nicht. Bei alleiniger intranasaler oder intratrachealer Applikation im Meerschweinchen kann sie Blutungen und Gewebse Nekrosen des Lungenepithelgewebes hervorrufen, die denen einer Legionelleninfektion ähneln. Zelluläre Infektionsversuche führten bislang jedoch zu kontroversen Ergebnissen in Bezug auf die Rolle von ProA bei der Vermehrung und Pathogenität von *L. pneumophila*.

Der erste Teil dieser Arbeit befasste sich mit der Optimierung der Produktion, Reinigung und Kristallisation der Protease. Im zweiten Teil wurden vielfältige, ProA-abhängige Phänotypen in Bezug auf das Wachstum, der Sekretion, der Verbreitung und der Virulenz von *L. pneumophila* identifiziert sowie weitere *Legionella*-Proteasen untersucht. Der dritte Teil beschäftigte sich mit dem Einfluss von ProA auf die proinflammatorische Antwort des Wirtes.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte natives ProA erfolgreich mittels Ammoniumsulfatfällung und Anionenaustauschchromatographie isoliert sowie die rekombinante Produktion und Reinigung optimiert werden. Unter Anwendung verschiedener Chromatographiemethoden wurde das rekombinante ProA über den Hexahistidin-Tag mit hohem Reinheitsgrad gewonnen. Es konnte eine maximale Ausbeute von 3-5 mg reinem, rekombinantem ProA aus 2 L Kultur erzielt werden. Erste Kristallisationsversuche zeigten Kristallbildungen insbesondere unter Zusatz von PEG.

Bei Wachstumsversuchen in YEB konnte für ProA kein Einfluss auf das Wachstum von *L. pneumophila* festgestellt werden. Jedoch zeigte sich, dass ProA den größten Anteil der extrazellulären Proteaseaktivität ausmacht. In CDM wurde für die *proA*-defiziente

1 Zusammenfassung

Mutante ein leicht verzögertes Wachstum detektiert. Jedoch wurde via SDS-PAGE und Western Blot festgestellt, dass ProA bei Wachstum in CDM nur in sehr geringen Mengen im Kulturüberstand vorhanden ist. Die Produktion von ProA konnte nicht durch Zugabe verschiedener Proteinquellen oder Ca^{2+} erhöht werden.

Massenspektrometrische Analysen ergaben, dass, im Vergleich zum Wildtyp, viele sekretorische Proteine im Kulturüberstand der *proA*-defizienten Mutante reduziert oder nicht vorhanden waren. Die Auswirkungen dieses veränderten Sekretoms wurden anhand zweier vermindert im Sekretom der *proA*-defizienten Mutante vorkommenden Proteine, KatG und LpC_3106, näher untersucht. Dabei zeigte sich, dass das veränderte Sekretom möglicherweise eine massive Auswirkung auf das Überleben von *L. pneumophila* in der Umwelt hat. In weiteren Analysen konnte für ProA ein Einfluss auf den für die *Sliding Motility* von *L. pneumophila* wichtigen Tensidfilm beobachtet werden. Infektionen von *A. castellanii*, *V. vermiformis* und THP-1-Makrophagen ergaben in allen Wirtsmodellen eine Rolle für ProA in der frühen Phase der Infektion sowie der intrazellulären Replikation. ProA hat weiterhin einen Einfluss auf die Vermehrung von *L. pneumophila* in humanen Lungengewebeexplantaten (HLTEs) und ist hauptverantwortlich für die Schädigung des Gewebes.

In dieser Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass ProA monomeres FlaA degradiert und so die Flagellin-vermittelte TLR5-Aktivierung, sowohl bei hTLR5 exprimierenden HEK-Zellen als auch bei Infektion von HLTEs mit *L. pneumophila*, verhindert. Bei Infektion von HLTEs konnte weiterhin ein Einfluss von ProA auf die CXCL8-Produktion im Gewebe beobachtet werden.

Im Rahmen dieser Studien konnte die Aminopeptidase PepN als möglicher Virulenzfaktor von *L. pneumophila* identifiziert werden. Dabei wurde für PepN sowohl eine Rolle bei der Ausbreitung mittels *Sliding Motility* als auch in der späten Phase der Infektion von *V. vermiformis* beobachtet.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse legen den Grundstein für weiterführende Studien, wie der Aufklärung der Kristallstruktur von ProA. Weiterhin wurden eine Vielzahl an neuen Phänotypen identifiziert, die einen wichtigen Beitrag zur Klärung der Rolle von ProA sowohl beim Überleben von *L. pneumophila* in der Umwelt als auch bei der Infektion von Wirtszellen und der Manipulation der proinflammatorischen Antwort liefern.

2 Summary

Legionella pneumophila is an ubiquitous, environmental bacterium which proliferates intracellularly within protozoa. It is able to enter the human lung via aerosols arising from poorly maintained water systems. In the human lung it replicates within alveolar macrophages and lung epithelial cells. The spread of the bacterium in the lung can cause severe damage to the pulmonary tissue, often resulting in atypical pneumonia. This so-called Legionnaires' disease can be fatal in 15-20 % of the cases. Responsible for the pathogenicity of *L. pneumophila* is a variety of virulence factors.

The zinc metalloprotease ProA is the most secreted protein of *L. pneumophila* and homologous to the elastase LasB from *P. aeruginosa* and thermolysin from *B. thermoproteolyticus*. The crystal structure of ProA has not been elucidated so far. Applied intranasally or intratracheally in guinea pigs it can cause bleedings and tissue necrosis of the lung epithel which are similar to an infection with *L. pneumophila*. Cellular infection experiments have so far led to controversial results regarding the role of ProA in proliferation and pathogenicity of *L. pneumophila*.

The first part of this thesis dealt with the optimization of production, purification and crystallization of ProA. In the second part diverse, ProA-dependent phenotypes related to the growth, secretion, spread and virulence of *L. pneumophila* were identified and further *Legionella*-proteases were studied. The third part of this thesis dealt with the influence of ProA on the proinflammatory response of the host.

In the context of this work, native ProA was successfully isolated by ammonium sulfate precipitation and anion exchange chromatography. Additionally the recombinant production and purification were optimized. Using various chromatographic methods, recombinant ProA was recovered via the hexa histidine-tag with a high degree of purity. It was possible to achieve a maximum yield of 3-5 mg pure, recombinant ProA from 2 L culture. First crystallization assays showed crystals in particular with the addition of PEG.

In growth experiments, ProA was not able to influence the growth of *L. pneumophila* in YEB. However, ProA showed the largest contribution to the extracellular protease activity. In CDM, a slightly lagged growth was detected for the *proA*-deficient mutant. Via SDS-PAGE and western blot it was found, that ProA is only present in very small amounts in the culture supernatant when grown in CDM. ProA-production could not be increased by adding different sources of protein or Ca^{2+} .

Mass spectrometric analysis revealed that, compared to the wildtype, many proteins

2 Summary

were reduced or not present in the culture supernatant of the *proA*-deficient mutant. The effects of this altered secretome were further investigated by means of the two proteins KatG and LpC_3106, that were reduced in the secretome of the *proA*-deficient mutant. It was found, that the altered secretome may have a massive effect on the survival of *L. pneumophila* in the environment. In further analyzes, an influence on the surfactant film, which is important for sliding motility of *L. pneumophila*, was observed for ProA.

Infections of *A. castellanii*, *V. vermiformis* and THP-1 macrophages showed, that ProA is important for the early stages of host infection as well as intracellular replication. Furthermore, ProA influences the proliferation of *L. pneumophila* in human lung tissue explants (HLTEs) and is primarily responsible for the tissue damage.

It could be further shown, that ProA degrades monomeric FlaA. Thus, ProA prevents flagellin-mediated TLR5-activation both in hTLR5-expressing HEK cells and in HLTE infection with *L. pneumophila*. In the case of HLTE infection, an influence of ProA on the CXCL8 production in the tissue was observed.

Within these studies, PepN was identified as a possible virulence factor of *L. pneumophila*. PepN was shown to play a role in both sliding motility and the late phase of *V. vermiformis* infection.

The results obtained in this work lay the foundation for further studies such as the elucidation of the ProA crystal structure. Furthermore, a large number of new phenotypes were identified that make a contribution to clarifying the role of ProA in environmental survival of *L. pneumophila*, the host infection and the manipulation of the proinflammatory response.

3 Einleitung

Die Legionärskrankheit wurde erstmals im Jahr 1976 beschrieben, als auf einem Kongress amerikanischer Kriegsversehrten im Bellevue Stratford Hotel in Philadelphia plötzlich zahlreiche Teilnehmer an einer atypischen Lungenentzündung litten. Von 221 erkrankten Personen starben damals 34 an dem bis dahin völlig unbekannten Erreger. Den Wissenschaftlern Joseph McDade und Charles Shepard vom *Center for Disease Control* (CDC) gelang es ein halbes Jahr später, ein Rickettsien-ähnliches Bakterium zu isolieren. In Anlehnung an die Veranstaltung und der pulmonalen Symptomatik der Erkrankung wurde es *Legionella pneumophila* genannt (Fraser et al., 1977, McDade et al., 1977). Mit Hilfe eines indirekten Immunfluoreszenztests konnten in den entsprechenden Patientenserum Antikörper gegen diesen Erreger nachgewiesen werden, wodurch auch eine Reihe früherer Ausbrüche der Krankheit aufgeklärt werden konnten (Osterholm et al., 1983, Ruckdeschel and Ehret, 1993). Dazu gehörte auch eine im Jahr 1968 erstmals beschriebene, grippeähnlich verlaufende Erkrankung, die sich mit Hilfe dieses Tests auf *L. pneumophila* zurückführen ließ. Bei dem sogenannten Pontiac-Fieber, das nach dem Ausbruchsort in Michigan (USA) benannt wurde, sind bis heute keine Todesfälle bekannt (Glick et al., 1978, Fields et al., 2002).

3.1 Legionellose und ihre Epidemiologie

Durch Kontakt mit kontaminierten, natürlichen Ressourcen wie Wasser, Luft oder Erde können Legionellen vom Menschen aufgenommen werden und dort eine Legionellose auslösen (Stout and Yu, 1997). Der häufigste Transmissionsweg erfolgt über *Legionella*-haltige Aerosole, welche durch Inhalation in die menschliche Lunge gelangen. Um eine Legionellose auszulösen ist eine Infektionsdosis von 1 - 100.000 Zellen notwendig, die jedoch auch stark vom infizierenden Stamm und dem Gesundheitszustand der Person abhängt (Fraser et al., 1977, Addiss et al., 1989, Delgado-Viscogliosi et al., 2005). In den meisten dokumentierten Legionellose-Fällen sind die Infektionsquellen auf kontaminiertes Trinkwasser zurückzuführen (Brunkard et al., 2011). In einigen wenigen Ländern, wie z. B. Neuseeland, gilt jedoch die Aufnahme von Legionellen über Kontakt mit Gartenerde als wichtigster Infektionsherd (Currie et al., 2014). Eine Mensch-zu-Mensch-Übertragung des Erregers wird stark bezweifelt (Molofsky and Swanson, 2004).

3 Einleitung

Eine Legionellose kann in zwei unterschiedlichen Formen auftreten: als Pontiac-Fieber oder als Legionärskrankheit. Das Pontiac-Fieber ist eine selbstlimitierende, von Fieber begleitete Erkrankung, die auf eine Infektion der oberen Atemwege zurückzuführen ist (Glick et al., 1978, Edelstein, 2007). Die grippeähnlichen Symptome treten meist innerhalb von 3 Tagen nach der Infektion auf und die Krankheit klingt in der Regel nach ca. 2-5 Tagen problemlos ab (Tossa et al., 2006). Obwohl das Pontiac-Fieber die am häufigsten vorkommende Form der Legionellose ist (mehr als 95 % der Fälle), wird es sehr häufig nicht als solches diagnostiziert (Pancer and Stypulkowska-Misiurewicz, 2003).

Die Legionärskrankheit ist eine potentiell tödlich verlaufende, atypische Pneumonie, die mit der Infektion der unteren Atemwege einhergeht (McDade et al., 1977). Symptome wie Kopf-, Muskel- und Thoraxschmerzen, hohes Fieber, Husten, Diarrhö und Verwirrtheit treten innerhalb von 2-10 Tagen nach der Infektion auf. Röntgenaufnahmen zeigen dabei gefüllte Alveolen, fokale Infiltration sowie Lungenverdichtungen mit oder ohne Pleuraerguss. Im Krankheitsverlauf kann es zu Nierenversagen und respiratorischer Insuffizienz kommen (Tsai et al., 1979, den Boer et al., 2002, Zhang et al., 2014, Benin et al., 2002). Gefährdet sind hier vor allem Raucher, ältere Menschen, Männer, Transplantationspatienten oder Personen mit Vorerkrankungen wie chronischen Lungenkrankheiten oder Diabetes mellitus (Marston et al., 1994, Breiman and Butler, 1998, Fields et al., 2002).

Seit Einführung der Meldepflicht für die Legionärskrankheit im Jahr 2001 lässt sich eine stetig ansteigende Inzidenz feststellen. Für das Jahr 2013 wurden dem Robert Koch-Institut (RKI) in Deutschland insgesamt 922 Fälle der Erkrankung gemeldet. Einen großen Anteil daran hatte ein Legionellen-Ausbruch in der Stadt Warstein im August und September 2013. Durch kontaminierte Abwässer einer industriellen Vorreinigungsanlage erkrankten 159 Personen an der Pneumonie, in deren Folge zwei Menschen verstarben (Maisa et al., 2015, Robert Koch-Institut, 2015). Trotz der Meldepflicht repräsentieren die erfassten Zahlen nur einen Bruchteil der tatsächlichen Fälle der Legionärskrankheit. Viele Legionellosen werden nicht als solche erkannt, da bei einer Pneumonie nicht immer spezifisch auf Legionellen getestet wird (Phin et al., 2014, Robert Koch-Institut, 2015). Oftmals sind die auftretenden Symptome von denen einer durch andere Bakterien wie Pneumokokken ausgelösten Pneumonie nicht zu unterscheiden (Dickgiesser et al., 1985, Den Boer et al., 2007). Zudem ist die Diagnose schwierig und auf wenige Serotypen beschränkt (Tronel and Hartemann, 2009).

Nach Angaben des Kompetenznetzwerkes für ambulant erworbene Pneumonien (CAP-NETZ) geht man allein für Deutschland von 15.000 bis 30.000 Erkrankungen jährlich aus (von Baum et al., 2008, von Baum and Lück, 2011).

3.2 Allgemeine Merkmale von *L. pneumophila*

Die Gattung *Legionella* gliedert sich phylogenetisch in die Familie der Legionellaceae ein, die der Klasse der γ -Proteobakterien untergeordnet ist (Benson and Fields, 1998). Derzeit sind 62 verschiedene Spezies bekannt, die 79 Serogruppen umfassen (Cazalet et al., 2004). Ungefähr die Hälfte der Spezies ist mit humanen Erkrankungen assoziiert, jedoch sind ca. 84 % der Fälle von Legionärskrankheit auf *Legionella pneumophila* der Serogruppe I zurückzuführen (Marston et al., 1997, Muder and Yu, 2002, Yu et al., 2002). Eine Ausnahme bildet hier die Art *L. longbeachae*, die im australischen Raum hauptverantwortlich für die Infektion mit Legionellen ist (Steele, 1989). Zu der Gattung *Legionella* zählen zusätzlich die *Legionella-like Amoebal Pathogens* (LLAP). Diese weisen hohe genomische Ähnlichkeiten zu Legionellen auf, sind jedoch schwerer zu kultivieren. Die Rolle dieser Bakterien als Humanpathogene ist bis heute weitestgehend unklar (Marrie et al., 2001, Adeleke et al., 2001, Alli et al., 2003). Bei *L. pneumophila* handelt es sich um obligat aerobe, monopolar begeißelte, Gram-negative Stäbchenbakterien (Abb. 3.1). Sie bilden keine Sporen aus und sind unbekapselt. Die Größe des Bakteriums ist stark abhängig von den Wachstumsbedingungen, der Wachstumsphase und seiner intra- oder extrazellulären Präsenz. Auf festen Medien haben Legionellen üblicherweise eine Länge von 2-20 μm und eine Breite von 0,3-0,9 μm (Katz et al., 1984, Diederer, 2008). Im Gegensatz zu anderen Gram-negativen Bakterien weist *L. pneumophila* eine relativ große Menge an langkettig-verzweigten Fettsäuren, jedoch keine bis wenige Spuren an Hydroxylsäuren auf (Moss et al., 1983, Lambert and Moss, 1989). Das Genom von *L. pneumophila* umfasst 3,3 bis 3,5 Mb und ca. 3000 verschiedene Gene, sowie bis zu drei unterschiedliche Plasmide (Cazalet et al., 2004).

L. pneumophila ist Katalase-positiv und lebt chemoorganotroph. Dabei nutzt es vor allen Dingen Aminosäuren als primäre Energiequelle, weshalb für die Anzucht unter Laborbedingungen mit L-Cystein und löslichen Eisensalzen angereicherte Nährmedien vonnöten sind (Pine et al., 1984, Eylert et al., 2010). Für ein optimales *in vitro*-Wachstum benötigen Legionellen einen pH-Wert von 6,9 und eine Temperatur von

3 Einleitung

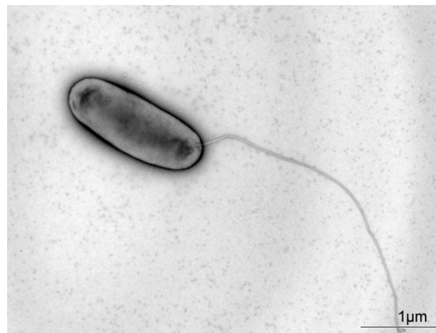


Abbildung 3.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *L. pneumophila*. Dargestellt ist die Negativkontrastierung des Bakteriums in der postexponentiellen Wachstumsphase (PE), Maßstab 1 μm (Sahr et al., 2009).

37 °C, wobei eine Vermehrung zwischen 25 °C und 50 °C möglich ist (Edelstein, 1981, Barker et al., 1986, Barker and Till, 1986, Lesnik et al., 2016).

Hervorgerufen durch abiotische Stressfaktoren wie hohe Temperaturen oder Nährstoffmangel kann *L. pneumophila* auch Dauerformen ausbilden. Dieser Status wird als *viable but not culturable* (VBNC) bezeichnet, da die Zellen zwar keine Kolonien auf Standard-Medien ausbilden, aber dennoch vital sind (Ducret et al., 2014). VBNC-Zellen sind sogar in der Lage Virulenzfaktoren zu produzieren (Alleron et al., 2013). Bisher konnten Legionellen in diesem Stadium nur durch Ko-Inkubation mit Amöben wie *A. castellanii* wieder reanimiert werden (Steinert et al., 1997).

3.3 Lebensraum, Wirte und Übertragung auf den Menschen

L. pneumophila ist omnipräsent in aquatischen Habitaten wie Seen und Flüssen, aber auch in terrestrischen Lebensräumen wie feuchten Böden (Atlas, 1999). Um in dieser nährstoffarmen Umgebung überleben zu können, kommen Legionellen unter anderem als Teil komplexer Biofilme vor (Rogers et al., 1994, Declerck et al., 2009). Obwohl unter Laborbedingungen auch reine Legionellen-Biofilme beobachtet werden können, scheint *L. pneumophila* in der Umwelt eher ein sekundärer Kolonisierer von bereits existierenden Biofilmen zu sein (Piao et al., 2006, Declerck, 2010, Stewart et al., 2012). Biofilme bieten Bakterien eine nährstoffreiche Umgebung und Schutz vor Gefahren aus der Umwelt. Jedoch sind sie auch eine ideale Nahrungsquelle für freilebende Protozoen. Da sich Legionellen nicht extrazellulär vermehren können, parasiti-

tieren sie unterschiedliche Ciliaten und Amöben wie *Vermamoeba vermiformis* (früher *Hartmannella vermiformis*) oder *Acanthamoeba castellanii*. Bisher sind dreizehn verschiedene Amöben- und zwei Ciliaten-Spezies bekannt, die von *L. pneumophila* als Wirt genutzt werden (Abb. 3.2 B).

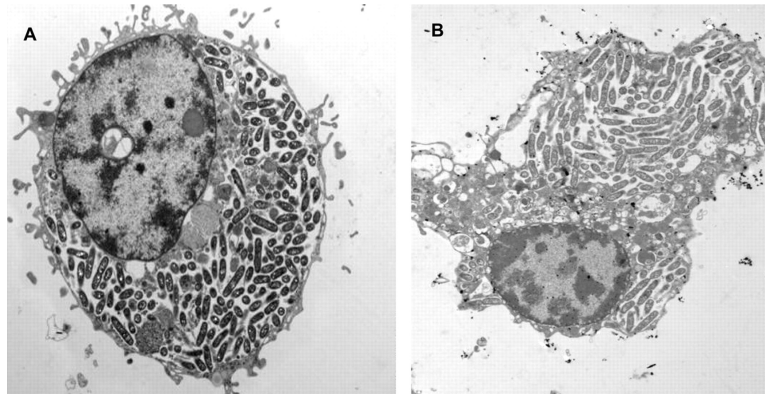


Abbildung 3.2: Elektronenmikroskopische Aufnahme von mit *L. pneumophila* infizierten Wirtszellen. Dargestellt ist die Infektion von U937 Makrophagen (A) und *Acanthamoeba polyphaga* (B) nach 24 h (Molmeret et al., 2005).

Unter Laborbedingungen ist *L. pneumophila* in der Lage, noch ein viel breiteres Wirtsspektrum zu parasitieren. Dazu gehören unter anderem Zellen wie embryonale Lungenfibroblasten, HeLa-, Hep2- und McCoy- Zellen, die soziale Amöbe *Dictyostelium discoideum* und Kc67-Zellen von *Drosophila melanogaster* (Wong et al., 1980, Daisy et al., 1981, Hägele et al., 2000, Solomon and Isberg, 2000, Dorer et al., 2006). Weiterhin wurde in den letzten Jahren die Larve der Wachsmotte *Galleria mellonella* als Modellorganismus etabliert (Harding et al., 2013). Als ein weiterer wichtiger Wirt hat sich der Nematode *Caenorhabditis elegans* erwiesen. Die Legionellen besiedeln hierbei den Verdauungstrakt und sind auch in der Lage, sich dort zu vermehren (Komura et al., 2010, Brassinga and Sifri, 2013). Es wird vermutet, dass Nematoden als natürliche Wirte für *L. pneumophila* dienen und eine wichtige Rolle bei der Persistenz und der Ausbreitung von Legionellen spielen (Rasch et al., 2016).

Durch die Infektion von Protozoen schafft sich der Erreger eine ideale, nährstoffreiche Nische für die intrazelluläre Replikation, in der er vor vielen Umwelteinflüssen und Hygienemaßnahmen geschützt ist (Barker et al., 1992, Harb et al., 2000, Murga et al., 2001). Diese Lebensweise ermöglicht *L. pneumophila* auch die Besiedelung von künstlichen Habitaten wie technischen Wasserleitungssystemen, in denen es durch seine hohe Thermotoleranz noch bei Temperaturen von über 50 °C wachsen kann (Thomas et al., 2004, Borella et al., 2005, Lesnik et al., 2016).

3 Einleitung

Eine wichtige Rolle bei *L. pneumophila*-Infektionen spielen unter anderem Warmwassersysteme, Kühltürme, Klimaanlage, Luftbefeuchter, Whirlpools, Autowasch- und Sprinkleranlagen. Weiterhin besteht im Zusammenhang mit Beatmungsgeräten und Dentaleinheiten ein erhöhtes Infektionsrisiko (Breiman et al., 1990, Seenivasan et al., 2005, Kumar et al., 2010, Lau et al., 2013). In der Lunge infizieren Legionellen primär alveolare Makrophagen (Abb. 3.2 A) und Monozyten, können sich jedoch auch in Typ I- und Typ II-Lungenepithelzellen replizieren und so in der Lunge ausbreiten (Cianciotto et al., 1995, Swanson and Hammer, 2000, Steinert et al., 2002).

3.4 Intrazellulärer Lebenszyklus

Die Aufnahme von *L. pneumophila* und seine Replikation verlaufen sowohl in Protozoen als auch in humanen Makrophagen vergleichbar und sind in ihren Grundcharakteristika sehr ähnlich. Das Hauptmerkmal ist, dass das Bakterium die Ansäuerung des Phagosoms unterbindet und dieses durch weitere Modifikationen in eine Replikationsnische, die *Legionella-containing vacuole* (LCV) umwandelt (Blatt et al., 1993, Venezia et al., 1994, Molmeret et al., 2005). Der intrazelluläre Lebenszyklus ist in Abbildung 3.3 dargestellt. Die Aufnahme von *L. pneumophila* geschieht meist mittels der konventionellen Phagozytose oder über die so genannte *Coiling*-Phagozytose (Horwitz, 1984). Bei dieser eher seltenen und nicht bei allen *L. pneumophila*-Serotypen auftretenden Form der Aufnahme bildet die Wirtszelle ein Pseudopodium aus, welches das Pathogen umschließt (Rechnitzer and Blom, 1989, Bozue and Johnson, 1996). Weiterhin ist eine Aufnahme über Makropinozytose möglich (Watarai et al., 2001, Peracino et al., 2010). Bei der Internalisierung von *L. pneumophila* durch Amöben ist ein spezieller, aus Galactose/N-Acetylgalactosamin (Gal/GalNAc)-Lektin zusammengesetzter Rezeptor von besonderer Bedeutung. Dieser Rezeptor gehört zu den Integrinen und besitzt eine Tyrosin-Kinase-Aktivität. Nach der Ligandenbindung kommt es in Folge einer Phosphorylierungskaskade zu einer Neuordnung des Zytoskellets (Venkataraman et al., 1997, Abu Kwaik et al., 1998a). In Makrophagen ist hingegen die Bindung des *major outer membrane proteins* (MOMP) an die Komplementfaktoren C3b und C3bi wichtig für die Anheftung, da dieser MOMP-C3b/C3bi-Komplex anschließend an die Komplementrezeptoren CR1 und CR3 auf der Oberfläche der Makrophagen bindet und zur Aktin-vermittelten Phagozytose der Bakterien führt (Payne and Horwitz, 1987, Bellinger-Kawahara and Horwitz, 1990, Krinos et al., 1999).

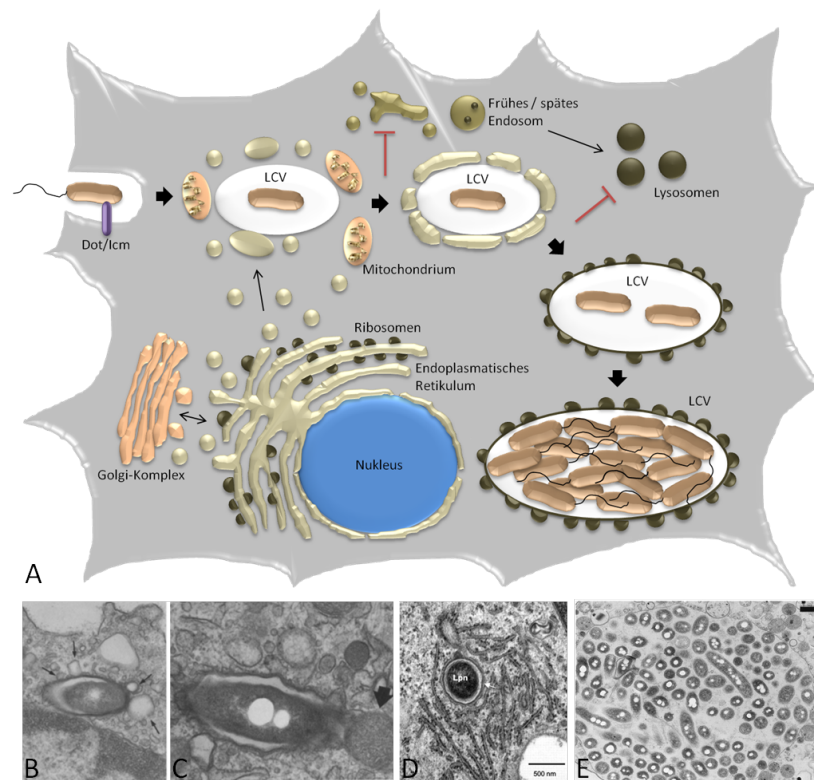


Abbildung 3.3: Intrazellulärer Lebenszyklus von *L. pneumophila*. (A) Dargestellt ist der schematische Ablauf des Infektionszyklus von *L. pneumophila* in Wirtszellen. Mittels konventioneller oder *Coinciding*-Phagozytose wird *L. pneumophila* von Amöben oder Makrophagen internalisiert. Durch Effektoren des Dot/Icm T4SS wird die Phagosomen-Lysosomen-Fusion verhindert. Es werden Vesikel des rauen ERs und Mitochondrien zur *Legionella-containing vacuole* (LCV) rekrutiert, die später mit dieser fusionieren. Durch Aktivierung replikativer Gene kommt es zur massenhaften Vermehrung der Bakterien in der Replikationsvakuole, gefolgt von der Lyse der Wirtszelle. (B, C) EM-Aufnahme von *L. pneumophila* in Monozyten 15 min nach Infektion. Erkennbar ist das *Legionella*-haltige Phagosom umgeben mit glatten Vesikeln (B, x 32.400) und Mitochondrien (C, x 48.600). Modifiziert nach (Horwitz, 1983). (D) EM-Aufnahme von *L. pneumophila* in U937-Makrophagen 8 h nach der Infektion. Die LCV ist hier mit dem rauen ER assoziiert. Lpn: *L. pneumophila*, Maßstabsbalken: 500 nm, modifiziert nach (Molmeret et al., 2004). (E) TEM-Aufnahme von *L. pneumophila* in *D. discoideum* nach 3-tägiger Infektion. Zu erkennen ist hier die mit Bakterien gefüllte Replikationsvakuole. Maßstabsbalken: 500 nm, modifiziert nach (Solomon et al., 2000).

Alternativ können opsonisierte Legionellen über einen Fc-Rezeptor ebenfalls komplementabhängig internalisiert werden (Husmann and Johnson, 1992). Für die Effizienz der Phagozytose von *L. pneumophila* ist ein intaktes Dot/Icm (*defect in organelle trafficking and intracellular multiplication*) Typ IV-Sekretionssystem (T4SS) von essentieller Bedeutung (Hilbi et al., 2001, Vogel et al., 1998). Schon etwa 5 min nach der Internalisierung und der Bildung der LCV verhindert *L. pneumophila* die Interaktion mit dem lysosomalen Netzwerk. Etwa 15 min nach der Infektion ist die LCV bereits

3 Einleitung

mit einer Vielzahl an glatten Vesikeln umgeben (Swanson and Isberg, 1995, Bozue and Johnson, 1996). Für die Reifung der LCV in eine replikative Vakuole zeigten Studien eine Entwicklung über zwei Phasen. In der ersten Phase werden Vesikel des rauen Endoplasmatischen Retikulums (ER) rekrutiert, welche mit der LCV fusionieren. Die zweite Phase involviert die Fusion mit dem ER, wobei die replikative Vakuole entsteht. Dabei scheint das raue ER als eine Art Protein-Lieferant zu dienen. Jedoch ist die Fusion nicht bei allen *Legionella*-Spezies zu beobachten (Abu Kwaik et al., 1998b, Kwaik, 2000).

Etwa 4 h nach der Aufnahme von *L. pneumophila* ist die Membran der Vakuole verdickt und zusätzlich mit Ribosomen und Mitochondrien umgeben. Zu diesem Zeitpunkt beginnt auch, mit einer Generationszeit von ungefähr 2 h, die Replikation des Bakteriums innerhalb der LCV (Horwitz, 1983, Robinson and Roy, 2006, Sherwood and Roy, 2016). Ungefähr 24 h nach der Infektion kommt es zur Lyse der Wirtszelle und anschließender Neu-Infektion benachbarter Zellen (Shuman et al., 1998). Diese Lyse kann physikalisch, durch Entwicklung eines hochvirulenten und motilen Phänotyps von *L. pneumophila* erklärt werden (Rowbotham, 1986, Byrne and Swanson, 1998). Weiterhin kann es, ausgelöst durch die Immunantwort der Wirtszelle in Reaktion auf bakterielle Virulenzfaktoren wie Flagellin sowie Effektoren des T4SS, zur Porenbildung sowohl in der LCV als auch in den Wirtszellmembranen kommen. Die Stabilität der Vakuole ist somit nicht mehr gegeben und es kommt zur Lyse der Wirtszelle (Molmeret and Abu Kwaik, 2002, Molmeret et al., 2004, Silveira and Zamboni, 2010). Eine weitere Möglichkeit ist das Verlassen des Wirtes durch eine Dot/Icm-vermittelte Apoptoseinduktion über den Caspase-3-Signalweg (Zink et al., 2002, Hubber and Roy, 2010).

3.5 Virulenzfaktoren

Als pathogenes Bakterium ist *L. pneumophila* in der Lage, sich intrazellulär zu vermehren. Dabei nutzt es verschiedene Protozoen und Säugetierzellen als Wirt. Für ihre Pathogenität, die durch Eigenschaften wie Adhärenz an Wirtszellen, intrazelluläres Überleben und Replikation sowie Ausbreitung von Wirt zu Wirt charakterisiert ist, benötigen die Bakterien eine Vielzahl an Virulenzfaktoren (Fields et al., 2002). Einige der wichtigsten sind in den folgenden Unterkapiteln aufgeführt.

3.5.1 Sekretionssysteme

L. pneumophila ist in der Lage, eine Vielzahl an Faktoren zu sezernieren, die wichtig für die Virulenz und die intrazelluläre Replikation sowie das Überleben des Bakteriums innerhalb der Wirtszelle sind. Eines der wichtigsten Sekretionssysteme ist dabei das Dot/Icm Typ IVB-Sekretionssystem (T4SS). Über 300 potentielle Effektoren können mittels dieses Systems in die Wirtszelle geschleust werden, wobei viele von ihnen ähnlich zu eukaryotischen Proteinen sind (Brüggemann et al., 2006, Charpentier et al., 2009). Dabei bindet ein Großteil dieser Faktoren an Wirtsproteine und kontrolliert so den sekretorischen Transport oder die Translation und ermöglicht die Bildung einer Replikationsvakuole für *L. pneumophila* (Luo and Isberg, 2004). So wird zum Beispiel die Rekrutierung der Wirtsfaktoren Rab1 und Arf1 zur LCV über die Effektoren SidM/DrrA und RalF ausgelöst. Andere Dot/Icm-Substrate sind an der Rekrutierung von Vesikeln des rauen ER beteiligt, wie LidA, welches an der zytoplasmatischen Seite der LCV bindet und mit SidM/DrrA interagiert (Machner and Isberg, 2006, Neunuebel et al., 2011). In aktuelleren Studien wurde das neue Zink-Metallophospholipase C-Protein PlcC/CegC1 gefunden, das zusammen mit PlcA und PlcB wichtig für die Virulenz von *L. pneumophila* ist (Aurass et al., 2013).

Mutationen, die die Expression oder Funktion des T4SS stören, können zum kompletten Verlust der Virulenz von *L. pneumophila* führen. Ein wichtiges Schlüsselprotein ist dabei das mit der inneren Membran assoziierte DotA. DotA-defiziente Mutanten werden daher häufig als Negativkontrolle bei der Untersuchung von Pathogenitätsmechanismen eingesetzt (Berger and Isberg, 1993, Roy and Isberg, 1997). Legionellen besitzen auch ein zweites T4SS, das sogenannte Lvh-System (*Legionella vir homologues*), welches zu der Klasse der Typ IVA-Sekretionssysteme gehört. Es ist vermutlich für die Translokation von DNA sowie verschiedener Virulenzfaktoren notwendig und komplementiert manche Funktionen des Dot/Icm-Systems (Bandyopadhyay et al., 2007, 2013).

Eine große Rolle für die Pathogenität von Legionellen spielt weiterhin das Typ II-Sekretionssystem (T2SS) Lsp, das für die volle Virulenz und Persistenz in der Umwelt von Bedeutung ist (Soderberg et al., 2008, Soderberg and Cianciotto, 2010). Über das T2SS werden 25-60 verschiedene Proteine, Enzyme und Substrate in die Umwelt ausgeschleust. Dazu gehören unter anderem die Zink-Metalloprotease ProA, Lipasen, die Phospholipasen A und C, Lysophospholipase A, eine Cholesterol-Acyltransferase und RNAsen. Einige dieser Effektoren stehen im Zusammenhang mit Amöbeninfektionen

3 Einleitung

oder sind wichtig für die Infektion der Lunge (Rossier et al., 2008, Cianciotto, 2009, Rossier et al., 2009). Auch für die Infektion von Lungenepithelzellen und Reduktion der Cytokin-Produktion in Makrophagen und Epithelien ist das T2SS von Relevanz (McCoy-Simandle et al., 2011).

Das Lsp-System besteht aus 12 Komponenten, darunter auch die Prepilin-Peptidase PilD. Diese prozessiert das Pilin der Typ IV-Pili und Pseudopiline des T2SS (Liles et al., 1999). Weitere Komponenten sind das Außenmembran-Sekretin und die ATPase LspDE, die Pseudopiline LspFGHIJK, LspC und LspLM, wobei letztere wichtig für die Sekretion, das Überleben und die Virulenz von *L. pneumophila* sind (Rossier et al., 2004, Soderberg et al., 2004). *IspDE*-, *IspG*- oder *IspK*-defizienten Mutanten zeigten in Versuchen Defekte in der Replikation in Makrophagen und eine reduzierte Fähigkeit zur Replikation in Mäuselungen (Rossier and Cianciotto, 2001, Rossier et al., 2004). Weiterhin ist das T2SS wichtig für die Persistenz von *L. pneumophila* bei niedrigen Temperaturen und für die Translokation auf Agar-Oberflächen (Soderberg et al., 2008, Stewart et al., 2009).

Das Typ I-Sekretionssystem (T1SS) ist auf dem *IssXYZABD*-Locus codiert und enthält unter anderem die Komponenten LssB, einen ABC-Transporter, das Membran-Fusionsprotein LssD und TolC. Es spielt neben dem T2SS eine Rolle bei der *Sliding motility* von Legionellen und ist an der Wirt-Pathogen-Interaktion beteiligt (Jacobi and Heuner, 2003, Stewart et al., 2011). Das Tat-System von *L. pneumophila* ist wichtig für den Transport von gefalteten Proteinen über die innere Membran. Es beeinflusst die Biofilm-Bildung, die intrazelluläre Replikation und das Wachstum bei niedrigem Eisenangebot. Ein Tat-abhängiges Protein ist zum Beispiel die Phospholipase C PlcA (De Buck et al., 2005, Rossier and Cianciotto, 2005).

3.5.2 Die äußere Membran und Außenmembranvesikel

Wie viele Gram-negative Bakterien sind Legionellen in der Lage Außenmembranvesikel (*outer membrane vesicles*, OMVs) abzuschnüren (Shevchuk et al., 2011). Diese haben einen Durchmesser von 100-200 nm und bestehen aus einer Lipid-Doppelschicht. Sie beinhalten viele Komponenten der äußeren Membran, periplasmatische und viele Virulenz-assoziierte Proteine mit lipolytischer und proteolytischer Aktivität. Die Vesikel werden unter verschiedenen Wachstumsbedingungen sowohl extrazellulär als auch innerhalb der Wirtszelle abgeschnürt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sie an eukaryotische Membranen adhären und mit ihnen fusionieren können (Galka et al.,

2008, Jäger et al., 2015). OMVs allein sind sogar in der Lage, die Fusion von Phagosom und Lysosom bei der Wirtszellinfektion zu verhindern (Fernandez-Moreira et al., 2006). In einem neu etablierten Modell mit humanen Lungengewebs-Explantaten (HLEs) konnte gezeigt werden, dass die Außenmembranvesikel auf der Oberfläche alveolarer Makrophagen und im Zytoplasma zu finden sind. Inkubation von Lungengewebe mit OMVs führte zu einer signifikanten Zerstörung des Gewebes erkennbar durch Ablösung des Epithels in den Alveolen und Schädigung von Kollagen-Strukturen (Jäger et al., 2014).

Die äußere Membran von *L. pneumophila* besteht aus Phospholipiden, Lipoproteinen, Lipopolysacchariden (LPS) und Proteinen. Im Gegensatz zu vielen anderen Pathogenen fungiert das *Legionella*-LPS, das mit Lipid A in der äußeren Membran verankert ist, nicht als klassisches Endotoxin. Die Sekretion von Zytokinen von humanen Monozyten als Antwort auf eine Legionellen-Infektion fällt über 1000-fach geringer aus als bei Infektionen mit Enterobacteriaceae. Trotzdem gilt LPS als potentieller Virulenzfaktor (Neumeister et al., 1998). Das Lipid A besteht bei Legionellen aus ungewöhnlich langkettigen und verzweigten Fettsäuren mit daran gebundenen Legioaminoacidsäuren ohne Hydroxylgruppen. Die dadurch stark hydrophobe Oberfläche verhilft dem Bakterium zu einer verbesserten Adhärenz an Wirtsmembranen (Lück and Helbig, 2013).

3.5.3 Adhärenz-relevante Virulenzfaktoren

Der erste wichtige Schritt für die Infektion von Wirtszellen ist die Adhäsion an deren Membran. Daher sind bei diesem Prozess eine Vielzahl an Virulenzfaktoren beteiligt. Außer dem bereits erwähnten MOMP besitzt *L. pneumophila* weitere Adhärenz-relevante Faktoren wie Hsp60, Typ IV-Pili, LpnE oder RtxA.

Das 60 kDa-Chaperon Hsp60 wird auf dem *htp*-Gen codiert und erhöht die Invasion und Zytokin-Produktion in Makrophagen (Garduño et al., 1998). Oft wird es, eigentlich unüblich für dieses Protein, in Assoziation mit der bakteriellen Zelloberfläche gefunden und vermittelt die Adhärenz an Wirtszellen (Garduño et al., 2011). Weiterhin ist es an der Rekrutierung von Mitochondrien zur LCV beteiligt (Fernandez et al., 1996, Chong et al., 2009).

Typ IV-Pili von *L. pneumophila* sind durch eine konservierte, hydrophobe N-terminale Domäne charakterisiert und auf der Oberfläche von Legionellen lokalisiert (Strom and Lory, 1993). Durch die Anheftung an die Wirtszelloberfläche wird die Invasion des Bakteriums erleichtert. Des Weiteren spielen Typ IV-Pili bei der Bildung und der Ag-

3 Einleitung

gregation von *L. pneumophila* in Biofilmen, *Twitching Motility* und dem Überleben der Bakterien unter ständig wechselnden Umweltbedingungen eine Rolle (Coil and Anne, 2009). *Legionella*-Pili vermitteln auch die Aufnahme exogener DNA, indem sie als Rezeptoren für Bakteriophagen dienen und an der natürlichen Kompetenz und Konjugation von Legionellen beteiligt sind (Stone and Kwaik, 1999). In einer aktuellen Studie wurde das Außenmembranprotein PilY1 als ein weiterer wichtiger Virulenzfaktor charakterisiert. Es ist an der *Twitching motility* sowie Wirtszell-Adhäsion und -Invasion beteiligt und spielt eine Rolle bei der intrazellulären Replikation in humanen Lungengewebs-Explantaten (Hoppe et al., 2017).

Das *Sell-repeat*-Protein LpnE ist wichtig für die Aufnahme in THP-1-Makrophagen und A549-Epithelzellen, sowie die effiziente Infektion von *A. castellanii* und die Replikation in der Lunge von A/J-Mäusen. Zudem beeinflusst es das intrazelluläre *trafficking* der LCV (Newton et al., 2006, 2007b).

Weiterhin ist das Protein RtxA aus der Rtx-Familie (*repeats in toxin*) an der Anheftung und dem Eindringen in Wirtszellen beteiligt. Dies konnte bereits in Studien mit der Amöbe *A. castellanii* sowie humanen Epithelzellen und Monocyten gezeigt werden. Die genauen Mechanismen seiner Funktion sind jedoch bis jetzt unklar (Cirillo et al., 2000, 2002, D'Auria et al., 2008).

3.5.4 Mip und Eisenaufnahme

Eines der wichtigsten Virulenzfaktoren im Zusammenhang mit der intrazellulären Replikation von *L. pneumophila* ist die Peptidylprolyl-*cis/trans*-Isomerase (PPIase) Mip (*macrophage infectivity potentiator*). Das 24 kDa-Protein ist, als ein Homodimer, auf der äußeren Membran lokalisiert, wodurch es auch mit OMVs assoziiert ist (Schmidt et al., 1994, Riboldi-Tunnicliffe et al., 2001, Galka et al., 2008). Studien haben gezeigt, dass die PPIase wichtig für die intrazelluläre Replikation von *L. pneumophila* in Makrophagen, Epithelzellen und Amöben ist. Im Meerschweinchen- und Maus-Modell sind Mip-negative Mutanten attenuiert (Cianciotto et al., 1990a,b, Wintermeyer et al., 1995). Mip bindet an Kollagen IV und ermöglicht *L. pneumophila* damit die Transmigration durch Barrieren von NCI-H292 Lungenepithelzellen (Wagner et al., 2007). Weiterhin gehört es zur Familie der FK506-bindenden Proteine (FKBPs) und agiert synergistisch mit anderen sezernierten *Legionella*-Proteinen wie einer Phospholipase C (Riboldi-Tunnicliffe et al., 2001, Debroy et al., 2006). Kürzlich konnte auch gezeigt werden, dass Mip eine Rolle bei der Kolonisierung des Nematoden *Caenor-*

habditis elegans spielt (Rasch et al., 2016).

Von entscheidender Bedeutung, nicht nur für das Wachstum von *L. pneumophila*, sondern auch für die Virulenz und intrazelluläre Replikation, ist Eisen (James et al., 1995). So können sich Legionellen in Monozyten und Makrophagen, die zuvor mit einem Eisen-Chelator behandelt wurden, nicht vermehren (Byrd and Horwitz, 1989, 1991a,b). Wichtig für die Eisenaufnahme sind Siderophore. Bei Wachstum der Legionellen in chemisch-definiertem Medium (CDM), unter Bedingungen in denen wenig Eisen vorherrscht, kann eine Überproduktion des Eisen(III)-Chelators und Siderophors Legiobactin beobachtet werden. Legiobactin ist wichtig für das intrapulmonale Überleben von *L. pneumophila*, wird jedoch nicht von allen *Legionella*-Spezies gebildet (Liles et al., 2000, Allard et al., 2009). Für die Aktivität, Produktion und Export von Legiobactin sind die Gene *lbtA/B* notwendig, wobei LbtA Homologien zu Siderophor-Synthetasen aufweist und LbtB als Siderophor-Exporter in der inneren Membran verankert ist. Weiterhin spielen die Proteine LbtU, LbtC und Cyc4 eine Rolle bei der Eisenaufnahme im Zusammenhang mit Legiobactin (Allard et al., 2006, Yip et al., 2011, Chatfield et al., 2012).

Wichtig für die Aufnahme von Eisen(II) ist das in der inneren Membran lokalisierte Protein FeoB, über welches das Siderophor-gebundene Eisen in die Zelle gelangt. FeoB spielt eine Rolle beim extrazellulären Wachstum der Legionellen und unterstützt die Replikation in Makrophagen (Robey and Cianciotto, 2002, Cianciotto, 2007). Studien mit einer Doppelmutante von Legiobactin und FeoB zeigten, dass immer einer dieser beiden Aufnahmewege vorhanden sein muss, damit die Lebensfähigkeit und Virulenz von *L. pneumophila* voll ausgeprägt ist (Allard et al., 2006). Weitere Schlüsselfaktoren für die Eisenaufnahme sind die von *L. pneumophila* sezernierten Moleküle Homogentisinsäure (HGA), ein Abbauprodukt der Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin, und die polymerisierte Variante HGA-Melanin (Pyomelanin). Sie sind in der Lage Eisensalze zu reduzieren, wie sie in natürlichen, aquatischen Umgebungen oder Wirtszellen vorkommen und stimulieren das Wachstum von *L. pneumophila* unter Bedingungen, bei denen wenig Eisen vorhanden ist (Zheng et al., 2013). Essentiell für das Wachstum unter Eisen-limitierenden Bedingungen ist weiterhin die Multi-Kupfer-Oxidase McoL (Huston et al., 2008).

3.5.5 Regulatoren

Wie viele intrazelluläre Pathogene weist *L. pneumophila* einen biphasischen Lebenszyklus auf. In der replikativen Phase werden dabei nur wenige Virulenzfaktoren exprimiert. Jedoch sind Legionellen in der transmissiven Phase hoch motil und resistent gegenüber einer Vielzahl an Umwelteinflüssen (Byrne and Swanson, 1998). Für die Regulierung der für das Wachstum und die Virulenz benötigten Gene sind bei *L. pneumophila* eine Vielzahl an Faktoren beteiligt. Der alternative Sigmafaktor der RNA-Polymerase RpoS reguliert die Motilität, Natrium-Sensitivität, die Vermeidung des Endozytose-Weges sowie die Transmission und Virulenz von *L. pneumophila* (Bachman and Swanson, 2001, Abu-Zant et al., 2006). Weiterhin ist RpoS wichtig für die Stressresistenz und die Vermehrung in *A. castellanii* (Hales and Shuman, 1999b). Es reguliert die Expression von *fliA*, welches von besonderer Bedeutung für die kontakt-abhängige Zytotoxizität, Verhinderung der Phagosom-Lysosom-Fusion, Infektiösität und die Biofilmbildung ist (Molofsky et al., 2005, Mampel et al., 2006). In der exponentiellen Phase werden die Virulenz-assoziierten Gene *csrA*, *letE* und *flaA* nicht exprimiert. Auch *mip* und *proA* werden abhängig von RpoS transkribiert (Bachman and Swanson, 2004, Broich et al., 2006). Des Weiteren ist der alternative Sigmafaktor essentiell für die Porenbildung und die Anpassung an die intrazelluläre Umgebung während der Infektion. Auch wird eine Vielzahl an Dot/Icm-Effektoren durch RpoS reguliert (Zusman et al., 2002, Abu-Zant et al., 2006, Hovel-Miner et al., 2009).

Neben der Regulation über den alternativen Sigmafaktor RpoS spielen auch Zweikomponentensysteme sowie deren Vernetzung eine große Rolle bei der Virulenz von *L. pneumophila*. Ein solches ist das Zweikomponentensystem LqsRS, welches Virulenzprozesse wie die Phagozytose oder die Ausbildung der LCV reguliert. Es ist RpoS-abhängig und besteht aus dem Antwort-Regulator LqsR und der Sensor-Kinase LqsS. LqsR ist weiterhin LetA-abhängig und durch die *small* RNAs RsmY und RsmZ sowie CsrA reguliert. Dies zeigt, dass die Vernetzung der Regulation eine große Rolle bei der Virulenz der Legionellen spielt (Tiaden et al., 2007, 2008). Für die regulatorische Kontrolle vieler Gene, die bei dem Wechsel von der replikativen in die transmissive Phase von *L. pneumophila* von Bedeutung sind, ist das Zweikomponentensystem LetAS zuständig. Dieses agiert durch die Derepression von CsrA über kleine, nicht-codierende RNAs. Viele Gene der Flagellen-Synthese werden über LetAS reguliert (Hammer et al., 2002, Molofsky and Swanson, 2003, Gal-Mor and Segal, 2003a, Lynch et al., 2003).

Das CpxRA Zweikomponentensystem besteht aus dem CpxR Antwort-Regulator und der Histidin-Kinase CpxA. CpxRA ist ein direkter Regulator der Dot/Icm-Gene *icmR*, *icmV* und *icmW* sowie der *IvgA*-Gene und 11 weiterer Effektor-codierender Gene (Gal-Mor and Segal, 2003b, Altman and Segal, 2008). Ein weiteres Zweikomponentensystem ist PmrAB, welches aus dem Antwort-Regulator PmrA und der Sensor-Histidin-Kinase PmrB besteht. Ähnlich zu CpxR reguliert es Dot/Icm-abhängige Effektoren. Weiterhin aktiviert es die Expression Eukaryoten-ähnlicher Proteine, Gene des Dot/Icm-Apparates, Typ II-sezernierte Proteine, Gene der Stressantwort, Regulatoren der postexponentiellen Phase und Gene der Flagellen-Biosynthese (Zusman et al., 2007, Al-Khodori et al., 2009). Es wird vermutet, dass PmrB pH-abhängig reguliert wird. Das PmrAB-Regulon besteht aus 43 Effektor-codierenden Genen. Damit ist es das größte Effektor-Regulon von *L. pneumophila* und macht 15 % aller bekannten *Legionella*-Effektoren aus. Dazu gehören Proteine wie SidI, SidL und Lgt3, die mit der eukaryotischen Translations-Maschinerie interagieren, aber auch LepB, ein Rab GTPase-aktivierendes Protein (Fontana et al., 2011, Neunuebel et al., 2011).

3.6 Proteolytische Virulenzfaktoren

Proteolytische Enzyme spielen in Prokaryoten verschiedenste physiologische Rollen und sind essentielle Faktoren für die Kontrolle der Homöostase. Mikrobielle Proteasen können weiterhin, insbesondere bei opportunistischen Pathogenen, als Toxine die Infektion von Wirtszellen unterstützen. Wichtig sind hierbei besonders Metalloproteasen wie ProA, die bisher am besten charakterisierte Protease von *L. pneumophila*. In den folgenden Unterkapiteln sollen Metalloproteasen allgemein vorgestellt sowie insbesondere die *L. pneumophila*-Proteasen näher erläutert werden (Miyoshi and Shinoda, 2000).

3.6.1 Mikrobielle Metalloproteasen

Metalloproteasen binden ein oder zwei Metallionen in ihrem aktiven Zentrum. Die meisten Metalloproteasen sind mit Zn^{2+} assoziiert, jedoch können sie auch Mg^{2+} , Ni^{2+} oder Cu^{2+} enthalten. Die katalytischen Metallionen aktivieren Wassermoleküle, die als Nukleophile in der Katalyse dienen. Die meisten Metalloproteasen enthalten nur ein katalytisches Metallion und gehören zu den Endopeptidasen (Wu and Chen, 2011, Rawlings and Barrett, 2012). Sie werden in die vier Gruppen DD-Carboxypeptidasen,

3 Einleitung

Carboxypeptidasen, Inverzinkine und Zinkine eingeteilt (Abb. 3.4). Zu den Carboxypeptidasen zählen auch Mitglieder der M20-Familie der Metalloproteasen, wie die Carboxypeptidase G₂ (CPG₂) von *Pseudomonas* sp. strain RS-16. Diese gehört, im Gegensatz zu den meisten Metallopeptidasen, zu den Exopeptidasen und hydrolysiert Glutamat am C-Terminus von Peptiden (Minton et al., 1984, Sherwood et al., 1985, Rowsell et al., 1997, Krause et al., 2002).

Von besonderer Bedeutung sind die Zinkine, die sich durch ein His-Glu-X-X-His (HE-XXH) Zink-Bindemotif auszeichnen und nach der Lokalisierung ihres dritten Zink-Liganden eingeteilt werden (McKerrow, 1987, Bode et al., 1993, Hooper, 1994). Dazu gehören unter anderem Neurotoxine, die vor allem von *Clostridium botulinum* und *Clostridium tetani* gebildet werden und die Ausschüttung von Neurotransmittern inhibieren (Montecucco and Schiavo, 1994, Rossetto et al., 2014). Tetanus- und Botulinum-Neurotoxine (TeNT und BoNT) weisen ähnliche Strukturen auf und bilden Komplexe aus mehreren Untereinheiten. Die L-Untereinheit bildet dabei eine Metalloprotease, die SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*)-Proteine im Zytosol neuronaler Zellen der spaltet (Lacy et al., 1998, Swaminathan and Eswaramoorthy, 2000, Binz and Rummel, 2009, Pantano and Montecucco, 2014). Die Endopeptidase-24.11-Familie, die ebenfalls zu den Zinkinen zählt, basiert auf der Struktur der Säugetier-Endopeptidase Neprilysin, die das Zink-Bindemotif ENIAD-NGG aufweist (Le Moual et al., 1991). Diese ist auf der Zelloberfläche lokalisiert und inaktiviert regulatorische Peptide wie Enkephaline. Das aktive Zentrum mit der Zink-Bindestelle hat Ähnlichkeiten zu Thermolysin von *Bacillus thermoproteolyticus*. Für die Endopeptidase PepO von *Lactococcus lactis* wurden signifikante Sequenzhomologien zu Neprilysin nachgewiesen (Le Moual et al., 1993, Roques et al., 1993, Le Moual et al., 1994, Hooper, 1994). Weitere bakterielle Homologe sind PepO von *Streptococcus parasanguinis* und PgPepO von *Porphyromonas gingivalis*, welches homolog zu dem eukaryotischen *endothelin-converting enzyme* ECE-1 ist (Turner et al., 2000, Carson et al., 2002).

Die Angiotensin-*converting enzyme* (ACE)-Familie leitet sich von dem gleichnamigen Säugetier-Enzym ab, welches wichtig für die Kontrolle des Blutdrucks und des Elektrolythaushalts ist. In dem phytopathogenen Bakterium *Xanthomonas axonopodis* wurde das putative ACE XeACE identifiziert. Die 72 kDa Metalloprotease hydrolysiert ebenfalls Angiotensin I zu Angiotensin II. Insgesamt konnten ACE-ähnliche Enzyme in 19 verschiedenen Bakterien-Spezies nachgewiesen werden. (Riviere et al., 2007).

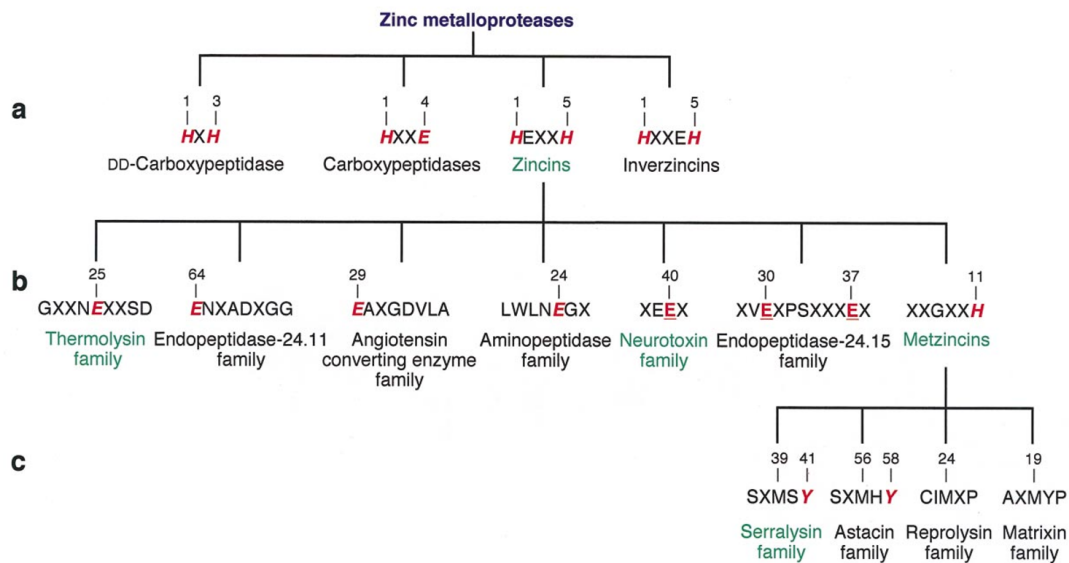


Abbildung 3.4: Übersicht über die Familie der Zink-Metalloproteasen. Die Darstellung basiert auf der Sequenz der Zink-Bindestellen. Die jeweiligen Zink-Liganden sind in rot dargestellt, putative Zink-Liganden sind unterstrichen. Das "X" repräsentiert eine beliebige Aminosäure. (A) Die vier Gruppen der Zink-Metalloproteasen. Diese werden nach dem ersten und zweiten Zink-Liganden eingeteilt. (B) Die jeweiligen Untergruppen der *Zincin Superfamily*. Diese werden nach dem dritten Zink-Liganden eingeteilt. Metalloproteasen mit einem putativen fünften Zink-Liganden werden in die Klasse der Metzinkine eingeteilt (C) (Miyoshi and Shinoda, 2000).

Der Prototyp für die Endopeptidase-24.15-Familie ist die Thimet-Oligopeptidase aus der Ratte. Das Zink-Bindemotif liegt hier in einer längeren Konsensussequenz vor als bei den anderen Zinkinen. Bei allen Mitgliedern dieser Familie ist der dritte Zink-Ligand einer von zwei konservierten Glutamat-Resten C-terminal zum Bindemotif in der Konsensussequenz. In diese Gruppe gliedern sich verschiedene bakterielle Oligopeptidasen. Dazu gehören z.B. OpdA von *Salmonella typhimurium*, welches unter anderem für die Degradierung von Signalpeptiden verantwortlich ist und Dipeptidyl-Carboxypeptidasen wie Dcp aus *E. coli*, die intrazelluläre Peptide verdaut (Hooper, 1994, Conlin and Miller, 2000, Comellas-Bigler et al., 2005).

Zu der Aminopeptidase-Familie gehören unter anderem PepN von *Lactobacillus delbrueckii* und die Aminopeptidase N von *E. coli*. Aminopeptidasen sind unter anderem an der Hydrolyse von Peptiden des Proteolyseweges oder an der N-terminalen Spaltung von Präproteinen beteiligt (Gonzales and Robert-Baudouy, 1996, Jankiewicz and Bielawski, 2003, Addlagatta et al., 2006).

Eine besondere Rolle innerhalb der bakteriellen Metalloproteasen spielen die Mitglieder der Serralyisin-Familie. Diese gliedert sich in die Gruppe der Metzinkine ein und

3 Einleitung

zeichnet sich durch das lange HEXXHXXGXXH Zink-Bindemotif aus. Das dritte Histidin des Motifs und ein Wassermolekül agieren als dritter und vierter Zink-Ligand. Ein potentieller fünfter Zink-Ligand, ein Tyrosin, sitzt an Position 41 der Konsensussequenz (Abb. 3.4) (Miyoshi and Shinoda, 2000). Zu dieser Familie gehört die Serralysin-Metalloprotease PrtS von *Serratia marcescens*. Die 51 kDa-Protease ist das meistsezernierte Protein des Bakteriums und ein wichtiger Virulenzfaktor bei pulmonaren Infektionen und der bakteriellen Keratitis (Lyerly et al., 1981, Lyerly and Kreger, 1983, Kamata et al., 1985, Letoffe et al., 1991). PrtS degradiert unterschiedliche, physiologisch wichtige Substrate wie Fibronektin, Kollagen und Serumproteine und zeigt zytotoxische Aktivität gegenüber humanen Epithelzellen (Molla et al., 1986, 1989, Shanks et al., 2015). Ein weiterer wichtiger Virulenzfaktor aus der Serralysin-Familie ist die alkalische Protease AprA von *P. aeruginosa*. Die Metalloprotease spaltet verschiedene Komponenten des Wirts-Immunsystems wie Zytokine und Interferone sowie monomeres Flagellin (Parmely et al., 1990, Bardoel et al., 2011).

Die Thermolysin-Familie

Die Thermolysin-Familie (auch M4-Familie) der Zink-Metalloproteasen beinhaltet mehr als 200 verschiedene Proteine aus Bakterien, Archaea und Pilzen. Der Prototyp für diese Familie ist Thermolysin aus *B. thermoproteolyticus*, dessen Struktur bereits 1972 entschlüsselt wurde (Matthews et al., 1972, Colman et al., 1972, Matthews et al., 1974). Alle Vertreter binden ein einzelnes Zinkion, welches durch drei Aminosäurereste und ein Wassermolekül koordiniert ist (Tronrud et al., 1992). Zusätzlich zu den beiden Histidin-Resten im HEXXH-Motif fungiert dabei Glutamat als dritter Zink-Ligand (Miyoshi and Shinoda, 2000). Typischerweise besitzen M4-Peptidasen eine Signalsequenz, die während des Exports abgespalten wird, ein Propeptid mit inhibitorischer und Chaperon-Funktion und eine Peptidase-Einheit (Abb. 3.5). Das Propeptid wird erst während der Sekretion abgespalten und die Protease damit aktiviert (Yeats et al., 2004).

Die Spaltung des Propeptids erfolgt autokatalytisch im Periplasma. Bis zur Sekretion durch die äußere Membran bleibt das Propeptid abgespalten mit der reifen Protease verbunden und wirkt wie ein Inhibitor, um eine intrazelluläre Proteolyse zu verhindern. Außerhalb der Zelle dissoziiert der Komplex und die Protease wird aktiviert (Braun et al., 1998). Metalloproteasen von *Vibrio cholerae* und *Vibrio vulnificus* besitzen zusätzlich zum N-terminalen noch jeweils ein C-terminales Propeptid, das ebenfalls au-

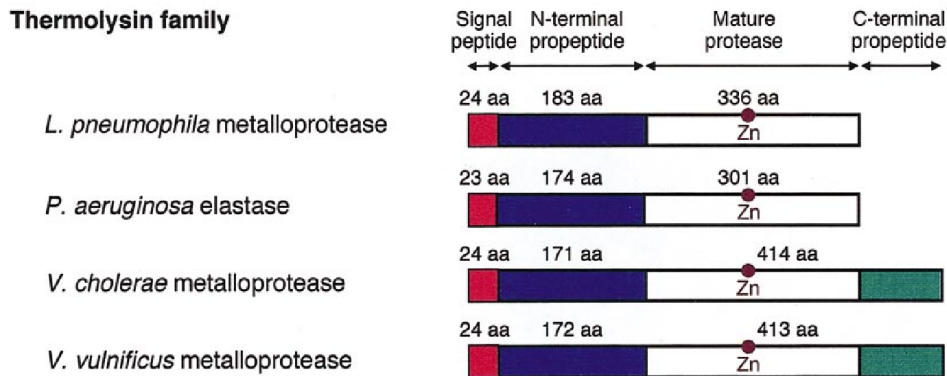


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung der inaktiven Vorstufen verschiedener M4-Proteasen. Die Metalloproteasen der Thermolysin-Familie (M4-Familie) werden als inaktive Vorstufen synthetisiert. In rot ist das jeweilige N-terminale Signalpeptid dargestellt, welches beim Export durch die innere Membran abgespalten wird. Im Periplasma erfolgt die Abspaltung des N-terminalen Propeptids (blau) durch einen autoproteolytischen Mechanismus. Die reife Protease (weiß) und das Propeptid trennen sich nach der Sekretion aus der Zelle, wodurch die Protease aktiviert wird. Die Metalloproteasen von *Vibrio cholerae* und *Vibrio vulnificus* tragen zusätzlich ein C-terminales Propeptid (grün) (Miyoshi and Shinoda, 2000).

tokatalytisch bei Temperaturen von 37 °C abgespalten wird (Miyoshi et al., 1997).

Als sezernierte Proteasen ist die Hauptaufgabe der Thermolysin-ähnlichen Proteine die Degradation extrazellulärer Proteine und Peptide für die Nährstoff-Gewinnung. Zusätzlich spielen sie eine Rolle als Schlüsselfaktoren in der Pathogenese verschiedener Krankheiten. Das γ -Toxin von *Clostridium perfringens* degradiert verschiedene Wirtsproteine und aktiviert Vorstufen von Clostridien-Toxinen. Weiterhin spaltet es Immunglobulin G, Komponenten des Komplementsystems, Fibrinogen, Fibronectin und α_2 -Makroglobulin und manipuliert so das wirtseigene Immunsystem (Jin et al., 1996).

Ein weiteres Thermolysin-ähnliches Protein ist Coccolysin aus *Enterococcus faecalis*. Dieses ist in viele unterschiedliche, durch das Bakterium verursachte Infektionen wie Harnwegsinfekte oder Lebensmittelvergiftungen verwickelt (Makinen et al., 1989). Die M4-Metalloprotease von *V. cholerae* greift unter anderem interzelluläre *Tight junctions* an (Wu et al., 2000). Es hydrolysiert Casein, Gelatine und Hämoglobin und inaktiviert humanes Endothelin-1 (Makinen and Makinen, 1994). Ein weiteres Mitglied der Thermolysin-Familie ist Pseudolysin (auch LasB), eine extrazelluläre Elastase von *P. aeruginosa*. Dieses kann einen direkten Effekt auf die Pathogenese des Bakteriums haben, indem es an der Zerstörung von Wirtszellfunktionen und Gewebestrukturen beteiligt ist. Indirekt wirkt es auch auf die Abwehrmechanismen der Wirtszelle, indem es

3 Einleitung

die Funktion von Wirtsproteasen beeinträchtigt. Die Elastase spaltet Casein, Elastin, humanes IgG, Kollagen (Typ III und IV) und Serum- α 1-Proteinase-Inhibitoren (Doring et al., 1981, Holder and Wheeler, 1984, Holder, 1985, Hersh and Morihara, 1986, Heck et al., 1986). Die Metalloprotease hat starke hämorrhagische Aktivität, Effekte auf die Zerstörung von Muskelgewebe und ist mit Lungeninfektionen assoziiert (Komori et al., 2001, Azghani et al., 2000, Vandivier et al., 2002, Yanagihara et al., 2003). In neuesten Studien konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Elastase von *P. aeruginosa*, ähnlich wie AprA, monomeres Flagellin spaltet und somit die damit verbundene proinflammatorische Reaktion der Wirtszelle unterbindet (Casilag et al., 2015).

3.6.2 Metalloproteasen von *L. pneumophila*

Nach Informationen der MEROPS-Datenbank für Peptidasen sind in den sequenzierten Genomen von *L. pneumophila* bisher 175 bekannte und putative Peptidasen kodiert. Davon sind 38 Metalloproteasen (Rawlings et al., 2016)¹. Trotz dieser hohen Anzahl wurden bisher nur sehr wenige dieser Proteasen beschrieben und auf ihre Funktionen hin untersucht. Die am besten charakterisierte Metalloprotease ist ProA, die im nächsten Kapitel ausführlicher behandelt wird. Weiterhin wurden für *L. pneumophila* die Aminopeptidasen LapA und LapB beschrieben. Beide Peptidasen werden über das T2SS sezerniert und haben ein Molekulargewicht von 35 kDa (DebRoy et al., 2006). LapA und LapB zeigen eine 42 %-ige Identität und 59 % funktionale Ähnlichkeit zueinander. Nach Informationen des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) können beide Aminopeptidasen Zink binden und gehören der M28-Familie der Metalloproteasen an². Deletionsmutanten beider Proteasen zeigten keinen Einfluss auf das Wachstum in Standard-Medium sowie die Typ II-Sekretion. Jedoch konnten in Kulturüberständen der LapA-negativen Mutante keine Leucin-, Phenylalanin- und Tyrosin-Aminopeptidaseaktivitäten festgestellt werden. LapB ist dagegen hauptsächlich für die Lysin- und Arginin-Aminopeptidaseaktivität von *L. pneumophila* zuständig. Somit scheint LapA eher gegen hydrophobe und LapB gegen positiv-geladene, hydrophile Aminopeptide gerichtet zu sein. Für die Infektion von Wirtszellen scheinen diese Aminopeptidasen jedoch nicht relevant zu sein (Rossier et al., 2008). Laut MEROPS-Datenbank besitzen Legionellen auch eine Oligopeptidase A (OpdA), die auf dem *prlC*-Gen codiert wird und sich in die Familie der Endopeptidase 24.15-

¹<http://merops.sanger.ac.uk>

²<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Familie eingliedert. Homologe Proteine wurden bisher für *E. coli* und *S. typhimurium* beschrieben. Das Protein ist allgemein eine multifunktionale Protease mit zwei unterschiedlichen aktiven Zentren. OpdA von *E. coli* ist eine Endoprotease und hydrolysiert unter anderem die Signalpeptide von Lipoproteinen (Novak et al., 1986, Novak and Dev, 1988). OpdA von *S. typhimurium* kann die Substrate *N*-Acetyl-L-Tetraalanin (AcAla₄) und Z-AALpNA spezifisch spalten (Conlin and Miller, 1992). Es wird vermutet, dass die Oligopeptidase eine Rolle bei der Degradierung fehlerhaft gefalteter Proteine und der Hitzeschock-Antwort spielt (Conlin and Miller, 2000).

Zu der Familie der M1-Proteasen gehört die Aminopeptidase PepN. Diese ist in Legionellen bisher nicht näher charakterisiert. Homologe Proteine sind in *E. coli*, *N. meningitidis* und *L. lactis* zu finden. PepN ist eine der wichtigsten Aminopeptidasen in Bakterien und unter anderem für die Hydrolyse von Substraten mit Arginin, Lysin und Alanin am N-Terminus zuständig (Addlagatta et al., 2006). Biochemische Analysen postulieren zwei verschiedene aktive Zentren, wobei eines für die gut etablierte Exopeptidase-Aktivität und das zweite vermutlich für eine Endopeptidase-Aktivität benötigt wird (Chandu and Nandi, 2003). In *L. lactis* ist das Protein in der Nutzung von Casein als Aminosäurequelle involviert (Kunji et al., 1996).

Weiterhin ist für *L. pneumophila* eine FtsH-Protease annotiert. Diese gliedert sich in die M41-Familie der ATP-abhängigen Metalloendopeptidasen ein (Rawlings et al., 2016). Das Protein wird auch als AAA-Protease (*ATPases associated with various cellular activities*) bezeichnet und ist in *E. coli* besonders gut charakterisiert. Das membrangebundene FtsH reguliert die LPS-Biosynthese, indem es die Enzyme LpxC und KdtA degradiert (Ogura et al., 1999, Katz and Ron, 2008). LpxC katalysiert den ersten Schritt der Lipid A-Biosynthese und KdtA die Addition des Oligosaccharids Kdo (2-Keto-3-deoxy-D-manno-oktulosonsäure) an Lipid A (Belunis et al., 1995, Young et al., 1995, Gronow and Brade, 2001).

In *L. pneumophila* ist neben ProA auch die Thermolysin-ähnliche Metalloprotease LasB zu finden. Diese weist Homologien sowohl zu ProA als auch zu der Elastase LasB (Pseudolysin) aus *P. aeruginosa* auf (vergleiche Kapitel 3.6.1). Möglicherweise existieren sogar mehrere *lasB*-Gene in *L. pneumophila*. Eine Beteiligung von *L. pneumophila*-LasB an Virulenz-assoziierten Prozessen wäre somit denkbar.

3.6.3 Die Zink-Metalloprotease ProA

Die Aktivität einer extrazellulären Protease für die Serotypen 1 - 6 von *L. pneumophila* wurde das erste Mal durch Thompson et al. im Jahr 1981 beschrieben. Das Protein wurde in großen Mengen im Kulturüberstand gefunden, woraus die häufig zu findende Bezeichnung *Major secretory protein* (Msp) entstand (Szeto and Shuman, 1990). Manche *Legionella*-Spezies, wie *L. micdadei* str. Tatlock, weisen jedoch wesentlich geringere oder gar keine extrazelluläre Proteaseaktivität auf (Berdal and Fossum, 1982). Erstmals isoliert und näher charakterisiert wurde das Protein im Jahr 1986 von Dreyfus and Iglewski. ProA wird durch einen 1.629 bp langen, offenen Leserahmen kodiert, welcher vollständig translatiert einem Präprotein bestehend aus 543 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 60,775 kDa entspricht (Black et al., 1990). Das *proA*-Gen ist hoch konserviert innerhalb der verschiedenen *L. pneumophila*-Stämme. Der genaue Regulationsmechanismus der *proA*-Expression ist nicht vollständig geklärt. Jedoch wurde beobachtet, dass *L. pneumophila* in nährstoffreichem Vollmedium mehr ProA produziert als in chemisch-definiertem Medium (Szeto and Shuman, 1990). Die Protease gehört zu den Thermolysinen (vergleiche Kapitel 3.6.1) und wird über das Typ II-Sekretionssystem sezerniert (Hales and Shuman, 1999a). Nach Abspalten der Signalsequenz und autokatalytischer Prozessierung des Propeptids liegt die reife Protease mit einem Molekulargewicht von 37,826 kDa vor (Moffat et al., 1994a). Eine optimale Enzymaktivität erreicht ProA bei pH-Werten zwischen 5,5 - 7,5 und Temperaturen unter 40 °C. Der isoelektrische Punkt des Proteins liegt bei 4,2 - 4,4. Essentiell für die Funktion der M4-Protease ist der Cofaktor Zn^{2+} . Dieser ist im aktiven Zentrum über die Liganden His³⁷⁷, His³⁸¹ und Glu⁴⁰¹ gebunden. Jedoch kann Zn^{2+} auch durch andere zweiwertige Ionen wie Fe^{2+} , Mn^{2+} oder Cu^{2+} vollständig oder partiell ersetzt werden. Die Proteaseaktivität kann durch Metall-Chelatoren wie Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA) oder *O*-Phenantrolin mittels Komplexbildung des Cofaktors inhibiert werden (Thompson et al., 1981, Dreyfus and Iglewski, 1986, Poras et al., 2012). Essentiell für die proteolytische Aktivität ist weiterhin die Glutaminsäure an Position 378 (Moffat et al., 1994a).

ProA weist große Homologien zur Elastase LasB aus *P. aeruginosa* und Thermolysin aus *B. thermoproteolyticus*, dem Namensgeber der M4-Familie, auf (Black et al., 1990). Die Kristallstruktur von LasB wurde bereits 1991 von Thayer et al. entschlüsselt. Aufgrund dieser Daten konnten Poras et al. 2012 die vorraussichtliche Struk-

tur von ProA modellieren (Abb. 3.6). Dieses Modell lässt vermuten, dass die katalytischen Zentren von beiden Proteinen identisch organisiert sind. Jedoch konnte in früheren Untersuchungen mit dem chromogenen Substrat MeO-Succinimid-Arg-Pro-Tyr-*p*-Nitroanilid gezeigt werden, dass dieses von allen Serogruppen von *L. pneumophila* gespalten wurde, jedoch nur gering bis gar nicht von anderen *Legionella*-Spezies sowie verschiedenen *Pseudomonas*- und Enterobacteriaceae-Stämmen (Berdal et al., 1982b,a, McIntyre et al., 1991). Dies demonstriert eine relativ hohe Spezifität von *L. pneumophila*-ProA für dieses Substrat. Weiterhin konnte in späteren Analysen die Komponente Ac-Ser-Lys-Gly-Pya-(3-NO₂)Tyr-Gly-Gly-Lys-NH₂ als spezifisches ProA-Substrat identifiziert werden (Poras et al., 2012).

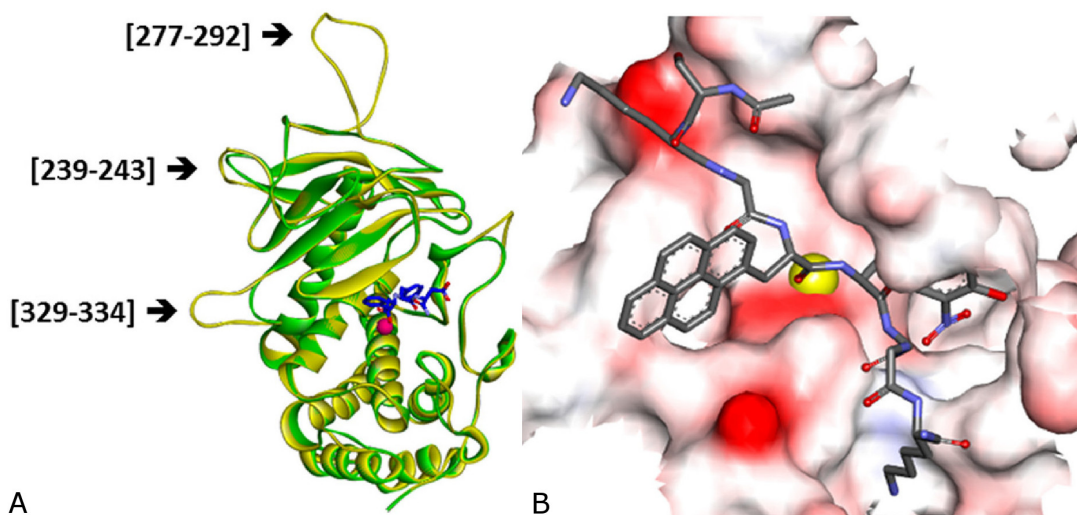


Abbildung 3.6: LasB-basiertes Modell der ProA-Struktur und des aktiven Zentrums. (A) Modell der voraussichtlichen ProA-Struktur (gelb) basierend auf der Kristallstruktur von LasB (*P. aeruginosa*, grün). Der Zink-Cofactor ist in rot dargestellt und der co-kristallisierte HPI-Inhibitor von LasB in blau. Die schwarzen Pfeile markieren die Loops von ProA. (B) Modellierung des aktiven Zentrums von ProA anhand des spezifischen Substrats Ac-Ser-Lys-Gly-Pya-(3-NO₂)Tyr-Gly-Gly-Lys-NH₂. Das Zink-Ion von ProA ist in gelb dargestellt (Poras et al., 2012).

Zu den Substraten von ProA gehören Casein, Gelatine, Kollagen und humane Serumproteine wie α_1 -Antitrypsin. Im Gegensatz zur *Pseudomonas*-Elastase gehört Elastin jedoch nicht dazu. Außerdem konnte für ProA eine hämolytische und zytotoxische Aktivität nachgewiesen werden (Müller, 1980, Thompson et al., 1981, Conlan et al., 1988a, Keen and Hoffman, 1989, Quinn and Tompkins, 1989). ProA inhibiert weiterhin die Produktion von toxischen Superoxidradikalen in humanen Neutrophilen und Monozyten und beeinflusst ihre chemotaktische Aktivität, wobei der genaue Mechanismus bis jetzt unklar ist (Sahney et al., 1990, Rechnitzer and Kharazmi, 1992, Sah-

3 Einleitung

ney et al., 2001). Des Weiteren spaltet ProA TNF- α sowie CD4 auf humanen T-Zellen und inaktiviert Interleukin-2 (Hell et al., 1993, Mintz et al., 1993). Eine regulatorische Funktion konnte für ProA in Bezug auf die Aktivierung lipolytischer Enzyme nachgewiesen werden. So interagiert die Protease direkt mit der Typ II-sezernierten Glykophospholipid:Cholesterol-Acyltransferase PlaC und prozessiert diese in ihre aktive Form (Rossier et al., 2004, Banerji et al., 2005, Lang et al., 2012).

Bereits erste Versuche mit gereinigtem ProA deuteten darauf hin, dass die Metalloprotease ein wichtiger Virulenzfaktor für *L. pneumophila* ist. Im Meerschweinchen-Modell verursacht ProA Läsionen im Lungengewebe, die pathologisch ähnlich zu Befunden von Legionellose-Patienten sind (Conlan et al., 1986, Williams et al., 1987, Conlan et al., 1988b). Nach intranasaler oder intratrachealer Inokulierung konnten Blutungen und Nekrosen des alveolaren Epithels und Endothels, gefolgt von massiver Einwanderung von PMNs und Makrophagen beobachtet werden (Baskerville et al., 1986). Versuche mit ProA-negativen Mutanten führten jedoch zu widersprüchlichen Ergebnissen. So konnten Blander et al. im Jahr 1990 keinen Einfluss von ProA auf den Krankheitsverlauf im Meerschweinchen-Modell nachweisen. Eine Vakzinierung der Meerschweinchen mit gereinigtem ProA ergab dagegen eine effektive Immunität gegenüber *L. pneumophila*. Spätere Versuche von Moffat et al. (1994b) zeigten wiederum, dass mit einem ProA-defizienten Stamm infizierte Meerschweinchen einen verzögerten Krankheitsverlauf und weniger nekrotische Gewebsschädigungen gegenüber Infektionen mit dem *L. pneumophila*-Wildtyp aufwiesen.

Versuche mit Meerschweinchen-Makrophagen führten ebenfalls zu kontroversen Ergebnissen. So konnten Moffat et al. (1994b) keinen Einfluss der Protease auf die Replikation nachweisen. Edelstein et al. beobachteten 1999 jedoch eine verringerte Vermehrung für eine ProA-defiziente Mutante in Meerschweinchen-Makrophagen. Infektionen humaner U937-Makrophagen ergaben für einen ProA-negativen *L. pneumophila*-Stamm eine Erhöhung des Interleukin-6-Levels, was auf einen Einfluss der Protease auf die proinflammatorische Antwort der Wirtszelle hindeutet (McCoy-Simandle et al., 2011). In humanen HL-60-Makrophagen sowie in der Amöbe *A. castellanii* ist die Protease nicht relevant für die intrazelluläre Replikation von *L. pneumophila* oder die Abtötung der Wirtszelle (Szeto and Shuman, 1990, Moffat et al., 1994b, Hales and Shuman, 1999a, Rossier et al., 2008). Jedoch konnte in *V. vermiformis* und dem Flagellaten *Naegleria lovaniensis* eine reduzierte Vermehrung für ProA-negative Mutanten beobachtet werden (Rossier et al., 2008, Tyson et al., 2013).

Schon in früheren Studien war es möglich, ProA auch intrazellulär nachzuweisen (Rechnitzer et al., 1992). Laut neuesten Erkenntnissen wird das T2S-sezernierte Protein dabei sogar aus der LCV transloziert, gelangt in das Wirtszell-Cytoplasma und assoziiert dort an der Außenseite der LCV (Abb. 3.7). Bereits 6 h nach Inokulation ist ProA in der Wirtszelle nachweisbar. Interessanterweise konnte die Translokation in humanen Makrophagen und Amöben, jedoch nicht in Mausmakrophagen beobachtet werden (Truchan et al., 2017).

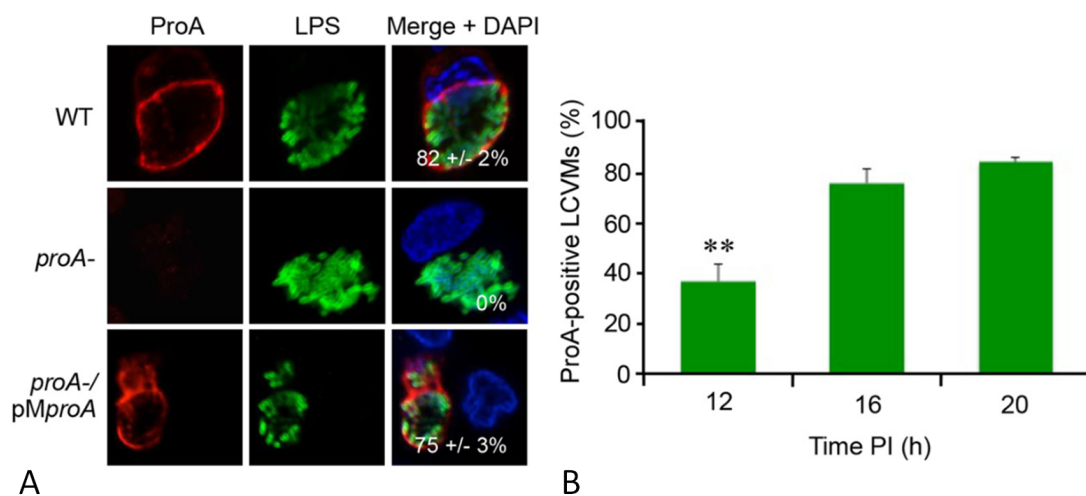


Abbildung 3.7: Lokalisierung von ProA in *L. pneumophila*-infizierten Makrophagen. (A) Humane Makrophagen (U937) wurden mit *L. pneumophila* WT, *proA*-defizienter Mutante und dem Komplementationsstamm (*proA*-/*pMproA*) für 16 h infiziert und mit spezifischen Antikörpern gegen ProA (links) und LPS (Mitte) behandelt. Die Wirtszellkerne und bakterielle DNA wurden mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, blau) markiert. Die Analyse erfolgte mittels Konfokalmikroskopie. Rechts sind zusätzlich die ProA-positiven LCV-Membranen (in % + SD) dargestellt. (B) Quantifizierung der ProA-positiven LCV-Membranen (in % + SD) 12 h, 16 h und 20 h nach Infektionsstart, Student's *t*-Test; **, $P < 0,01$ (Truchan et al., 2017).

3.7 Die Flagelle von *L. pneumophila*

Eine der am weitesten verbreiteten Motilitätsmechanismen von pathogenen Bakterien ist das Flagellum, ein helikal rotierender Propeller, welcher der schwimmenden Fortbewegung dient (Jarrell and McBride, 2008, Chen et al., 2011). Diese komplexe molekulare Maschinerie besteht aus ca. 30 verschiedenen Proteinen, die teils in vielen tausenden Kopien vorliegen (Macnab, 2003, Berg, 2003). Flagellen haben einen Durchmesser von ungefähr 20 nm und bei manchen Bakterien eine Länge von bis zu 20 µm (Doetsch and Sjoblad, 1980). Die meisten *Legionella*-Spezies sind in der Lage,

3 Einleitung

eine einzelne, polare Flagelle zu bilden (Ott et al., 1991). In einigen Stämmen, wie *L. israelensis*, *L. longbeachae* und *L. oakridgensis*, konnten jedoch keine Flagellen beobachtet werden (Heuner et al., 1995).

3.7.1 Allgemeiner Aufbau

Das Flagellum besteht aus drei verschiedenen Einheiten: dem Basalkörper, dem Haken und dem Filament. In Gram-negativen Bakterien umspannt der Basalkörper sowohl die innere als auch die äußere Membran. Der sogenannte MS-Ring, der in der inneren Membran lokalisiert ist, besteht aus ca. 26 Kopien des Proteins FliF und ist mit den Stator-Proteinen MotA und MotB über den C-Ring verbunden (Abb. 3.8) (Suzuki et al., 2004, Thomas et al., 2006). MotA und MotB liegen jeweils in 12-facher Kopie vor und formen einen Protonen-Kanal durch die Membran (Stolz and Berg, 1991). Die Energie für die Bewegung der Flagelle wird dabei durch einen Protonengradienten erzeugt. Jedoch ist der genaue Ablauf bis jetzt nur wenig erforscht (Altegoer et al., 2014).

Der C-Ring liegt auf der cytoplasmatischen Seite des MS-Rings und besteht aus den drei Komponenten FliM, FliN und FliG. Er ist wichtig für die Transmission von chemosensorischen Signalen in eine Drehbewegung der Flagelle. FliG schafft dabei eine Verbindung zwischen dem C-Ring und den Stator-Proteinen (Vartanian et al., 2012). Es wird vermutet, dass der C-Ring aus etwa 26-34 FliG-, 34 FliM- und 100 FliN-Molekülen besteht und einen Durchmesser von ca. 40-45 nm aufweist (Kawamoto et al., 2013). Bei Gram-negativen Bakterien besteht der sogenannte Stab, der dem MS-Ring aufsitzt, aus einem zentralen Kern und den P- und L-Ringen, die den Basalkörper mit der Peptidoglykanschicht und der äußeren Membran verbinden. Die beteiligten Komponenten sind FlgB, FlgC, FlgF, FlgG, FlgH und das Adapter-Protein FliE. Die P- und L-Ringe werden von vielen Kopien der Proteine FlgH und FlgL gebildet (Macnab, 2003).

Der Stab hat einen Durchmesser von ca. 10 nm und eine Länge von ca. 20 nm (Kubori et al., 1997). Der sogenannte Flagellen-Haken hat eine Länge von ca. 55 nm und verbindet den Basalkörper mit dem Filament (Berg and Anderson, 1973, Samatey et al., 2004). In Gram-negativen Bakterien besteht er aus dem Protein FlgE. Das Protein FlgD wird für den Aufbau benötigt. Es wird vermutet, dass weiterhin FlhB und FliK für die Kontrolle der Haken-Länge verantwortlich sind und durch Interaktion mit dem Sekretionsapparat eine Veränderung der Sekretions-Spezifität zu Filament-Substraten hervor-

rufen (Erhardt et al., 2011). Die Verbindung zwischen Haken und Filament schaffen die Proteine FlgK und FlgL. Am Anfang der Filament-Bildung ist außerdem das *Cap*-Protein FliD, das die Zusammensetzung des Filaments aus den Flagellin-Monomeren vermittelt, mit FlgL assoziiert (Macnab, 2003).

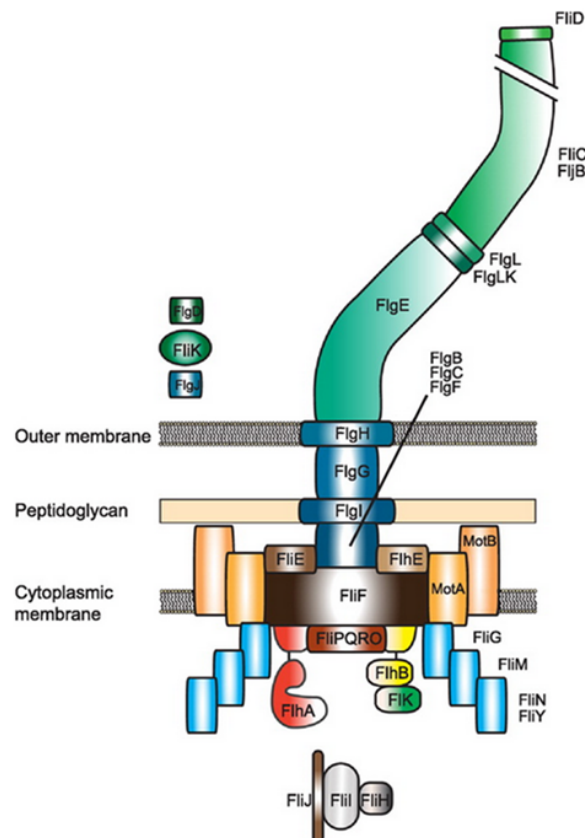


Abbildung 3.8: Schematische Darstellung des Flagellums Gram-negativer Bakterien. Der Basalkörper des Flagellums besteht aus einem MS-Ring (FliF), der über den C-Ring (FliM, FliN und FliG) mit MotA und MotB verbunden ist. Darauf sitzt der sogenannte Stab, der aus einem zentralen Kern und den P- und L-Ringen besteht. Die beteiligten Komponenten sind FlgB, FlgC, FlgF, FlgG, FlgH und FlgL. Der Flagellen-Haken besteht aus dem Protein FlgE. Für den Aufbau sind weiterhin die Proteine FlgD, FlhB und FliK wichtig. Die Verbindung zwischen Haken und Filament schaffen FlgK und FlgL. Für die Filamentzusammensetzung ist das *Cap*-Protein FliD essentiell. Das Filament selbst besteht aus tausenden Kopien des Proteins Flagellin (FliC, FljB oder FlaA bei *L. pneumophila*) (Altegoer et al., 2014).

Das Filament ist der längste Teil der Flagelle und besteht aus mehr als 20.000 Kopien des Proteins Flagellin (meist FliC, bei *L. pneumophila* FlaA). Die Flagellin-Monomere lagern sich in helikaler Form an, wobei 11 Moleküle eine Windung bilden (Yonekura et al., 2003, Heuner and Steinert, 2003). Die Kristallstruktur von *Salmonella typhimurium*-FliC zeigte, dass das Protein aus den drei Domänen D0, D1 und D2/3 besteht. D0-

3 Einleitung

und D1-Domäne bilden die N- und C-Termini des Flagellins und sind hoch konserviert zwischen den verschiedenen Bakterienspezies. Sie bilden die inneren und äußeren Ringe des Filaments. Die D2/3-Domänen zeigen dagegen hohe Sequenz-Variationen auf und kommen sogar in manchen Spezies, wie *Bacillus subtilis*, nicht vor. Nach dem Aufbau des Filaments sind diese Domänen auf der Oberfläche von diesem zu finden und tragen zur Antigenvariabilität des Flagellins bei (Samatey et al., 2001, Yonekura et al., 2003, Song and Yoon, 2014).

3.7.2 Regulation

Die Flagellierung von *L. pneumophila* ist auch immer mit einem virulenten Phänotyp und dem Übergang in die transmissive Phase assoziiert. Ausgelöst werden kann dieser Vorgang zum Beispiel durch Umwelteinflüsse wie bestimmte Temperaturen, Nährstoffmangel, der Wachstumsphase des Bakteriums oder der Viskosität des umgebenen Mediums (Ott et al., 1991, Bosshardt et al., 1997, Byrne and Swanson, 1998, Hammer et al., 2002, Li et al., 2015). Bei widrigen Umweltbedingungen wird das intrazelluläre Alarmon ppGpp, reguliert von RelA und SpoT, produziert (Abb. 3.9). RelA detektiert die Menge an verfügbaren, intrazellulären Aminosäuren und SpoT die der Fettsäuren (Hammer and Swanson, 1999, Dalebroux et al., 2009, 2010). Die Akkumulierung des Alarmons ppGpp führt zur Aktivierung von RpoS sowie des Zweikomponentensystems LetAS (vergl. Kapitel 3.5.5). Neben dem Einfluss dieser globalen Regulatoren ist das Flagellen-Regulon von *L. pneumophila* in einem Netzwerk aus vier verschiedenen Genklassen organisiert.

Der sogenannte Masterregulator FleQ ist eines von drei in *L. pneumophila* bekannten *Enhancer-binding*-Proteinen. Dieser initiiert zusammen mit dem σ^{54} -Faktor RpoN die Transkription von Genen des Flagellen-Regulons (Jacobi et al., 2004, Wigneshweraraj et al., 2008, Albert-Weissenberger et al., 2010). Homolog zu *P. aeruginosa* werden dabei Gene der Klasse II wie *fliE*, *fliM* und *fliK* aktiviert (Dasgupta et al., 2003). Durch FleQ wird weiterhin die Expression von Klasse III-Genen wie die der Stator-Proteine MotA und MotB reguliert. Die Expression von *fleQ* selbst wird vermutlich durch den σ^{70} -Faktor RpoD reguliert. Weiterhin wurde eine Vfr-Bindestelle identifiziert, die sich mit dem *fleQ*-Promotorelement überlappt (Jacobi et al., 2004). Der alternative σ^{28} -Faktor *fliA* wird vermutlich über CsrA reguliert und veranlasst die Expression der Klasse IV-Gene wie *flaA*, *fliDS* und *motY* (Heuner et al., 1995, 1997, 2002, Heuner and Albert-Weissenberger, 2008). Für FleR wird vermutet, dass es zusammen mit RpoN

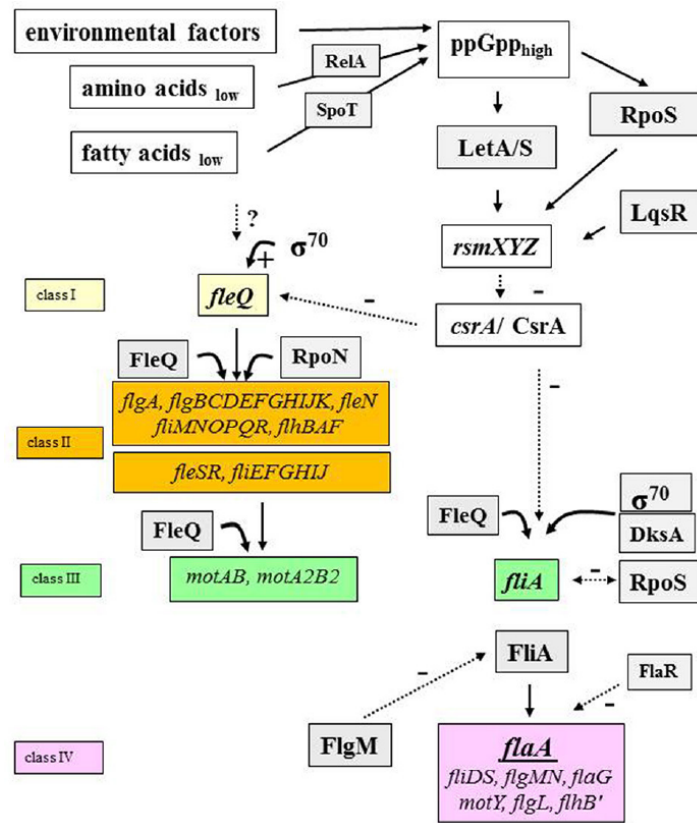


Abbildung 3.9: Postuliertes Flagellen-Regulon von *L. pneumophila*. Durch Umwelteinflüsse oder Nährstoffmangel kann der Regulationsweg über das Alarmon ppGpp aktiviert werden, was zur Aktivierung von RpoS und des Zwei-Komponentensystems LetAS führt. Die regulierten Gene werden in die Klassen I-IV eingeteilt. Der Masterregulator FleQ wird durch den σ^{70} -Faktor RpoD reguliert. Zusammen mit dem σ^{54} -Faktor RpoN initiiert FleQ die Expression der Klasse II- und III-Gene. In *L. pneumophila* Corby wird der σ^{28} -Faktor FliA vermutlich durch CsrA und RpoS reguliert und ist verantwortlich für die Expression der Klasse IV-Gene wie *flaA*. FlaR reprimiert die Transkription von FlaA (Appelt and Heuner, 2017).

als Teil einer negativen Rückkopplungsschleife die Expression der Flagellen-Gene unterbindet, sobald diese nicht mehr benötigt werden (Albert-Weissenberger et al., 2010). Für die Repression von *flaA* ist das DNA-bindende Protein FlaR verantwortlich (Heuner et al., 2000).

3.7.3 Rolle in der Virulenz von *L. pneumophila*

Wie bereits in Kapitel 3.7.2 erwähnt, ist die Flagelle von *L. pneumophila* mit der Ausprägung eines virulenten Phänotyps verknüpft. Ein wichtiger Faktor dabei ist die Motilität des Bakteriums. Eine Korrelation zwischen Virulenz und Motilität wurde bereits

3 Einleitung

früh für viele Pathogene beschrieben (Drake and Montie, 1988, Liu et al., 1988, Allison et al., 1992, Mobley et al., 1996). Motilität spielt auch eine Rolle bei der Ausbildung von Biofilmen (O'Toole and Kolter, 1998, Lemon et al., 2007, Guttenplan and Kearns, 2013). Dieser Umstand ist möglicherweise relevant für das Überleben von *L. pneumophila* in seiner Umgebung. In ersten Studien, die einen Link zwischen der Virulenz und einem flagellierten Phänotyp von *L. pneumophila* herstellten, konnte gezeigt werden, dass sich nicht-flagellierte Insertionsmutanten schlechter in *V. vermiformis* und der Makrophagen-ähnlichen Zelllinie U937 vermehren können (Pruckler et al., 1995). Eine Insertions-Mutation in dem *fliI*-Gen von *L. pneumophila*, die zu einem Verlust von Oberflächen-lokalisiertem Flagellin führte, zeigte jedoch keinen Effekt auf die intrazelluläre Replikation in U937-Zellen. Dies lässt vermuten, dass das Zusammensetzen der Flagelle hierbei keine Rolle spielt (Merriam et al., 1997). Auch Dietrich et al. konnten 2001 beobachten, dass Flagellen-defiziente Mutanten von *L. pneumophila* in *A. castellanii* und HL-60-Zellen attenuiert sind. Jedoch wurde auch hier gezeigt, dass die intrazelluläre Replikation nicht beeinflusst wird. Dafür konnte ein Effekt auf die Etablierung der Infektion und der Invasionsfähigkeit festgestellt werden, was für eine Rolle der Flagelle in der frühen Phase der Infektion von Wirtszellen spricht. Wahrscheinlich ist auch, dass hauptsächlich ein motiler Phänotyp wichtig für die Adhäsion ist und nicht die Flagelle selbst. Dies konnte durch Versuche mit Deletionsmutanten der Statorproteine MotA und MotB bestätigt werden (Molofsky et al., 2005). Auch das Flagellin FlaA erhöht die Invasionsfähigkeit von *L. pneumophila*, beeinflusst jedoch nicht die Adhäsion oder intrazelluläre Replikation (Dietrich et al., 2001). Weiterhin mit der Virulenz von *L. pneumophila* assoziiert ist der alternative Sigmafaktor FliA. Dieser ist wichtig für die Motilität, das intrazelluläre Wachstum in *D. discoideum* und die effiziente Infektion und Zytotoxizität in murinen Makrophagen (Hammer et al., 2002, Heuner et al., 2002, Molofsky and Swanson, 2003). Eine Rolle von FliA in der Biofilm-Bildung und in der Regulation der Produktion eines Melanin-ähnlichen Pigments zum Schutz vor UV-Strahlung konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Molofsky et al., 2005, Mampel et al., 2006). Wichtig für die Pathogenität der Legionellen ist auch das Zweikomponentensystem FleR/FleS. Insertionsmutanten dieser Regulatoren zeigten eine schlechtere Vermehrung in *A. castellanii* und Defizite in der Invasion (Polesky et al., 2001). Des Weiteren wird die kontaktabhängige Hämolyse durch FleQ und RpoN erhöht (Heuner et al., 2006).

3.7.4 Das FlaA-Protein von *L. pneumophila*

Das Flagellin von *L. pneumophila* bildet mit 47 kDa die größte Untereinheit der Flagelle (Elliott and Johnson, 1981, Ott et al., 1991). Das *flaA*-Gen codiert einen 1.428 bp großen offenen Leserahmen, welcher für 475 Aminosäuren codiert. Vergleiche der Aminosäuresequenz von FlaA mit dem Flagellin anderer Bakterienspezies ergaben hohe Homologien der N-terminalen und C-terminalen Aminosäuren. Bei Untersuchungen von *L. pneumophila*-Umweltisolaten wurden jedoch 14 verschiedene Genotypen von *flaA* gefunden, was für eine hohe Differenzierung zwischen den *L. pneumophila*-Serogruppen und den vorherrschenden Umweltbedingungen spricht.

Das Flagellin wird temperaturabhängig exprimiert und bei Temperaturen über 37 °C nicht mehr gebildet. Die Transkription von *flaA* wird von dem σ^{28} -Faktor reguliert (vergleiche Kapitel 3.7.2). Die meisten *Legionella*-Stämme tragen das *flaA*-Gen, jedoch sind einige dieser Stämme, wie *L. bozemanii* und *L. feeleii*, trotzdem nicht in der Lage, eine Flagelle auszubilden (Ott et al., 1991, Heuner et al., 1995, 1997, Amemura-Maekawa et al., 2008). Weiterhin ist die Expression von FlaA abhängig von der Wachstumsphase und weiteren Umweltfaktoren wie Nährstoffangebot, Osmolarität und Viskosität (Heuner et al., 1999).

Flagellin ist ein Virulenz-assoziiierter Faktor. So zeigen FlaA-defiziente Mutanten eine verringerte Invasionseffizienz in Amöben und HL-60-Zellen. Jedoch hat der Verlust des Flagellins keinen Einfluss auf die Adhäsion und die intrazelluläre Vermehrung in diesen Zellen (Dietrich et al., 2001). In den humanen Lungenepithelzelllinien A549 und NCI-H292 konnte für FlaA-defiziente Legionellen eine verminderte Replikationsfähigkeit nachgewiesen werden (Teruya et al., 2007). Gegenteilige Ergebnisse zeigten Versuche mit einer deutlich geringeren MOI, wobei eine *flaA*-negative Mutante eine signifikant höhere Replikation in A549-Zellen und THP-1-Makrophagen aufwies (Vinzing et al., 2008).

FlaA stimuliert die proinflammatorische Zytokinproduktion in Lungenepithelzellen sowie murinen und humanen Makrophagen (Heuner et al., 2002, Hawn et al., 2003, Molofsky et al., 2005). Wie in Kapitel 3.8.1 näher erläutert, kann FlaA über TLR5 erkannt werden (Hawn et al., 2003). In alveolaren Makrophagen ist die TLR5-vermittelte FlaA-Detektion in die Rekrutierung von polymorphnuklearen Neutrophilen (PMNs) und der Sekretion von TNF- α , IL-6 und der Chemokine MIP-2 und KC involviert (Hawn et al., 2007). In Lungenepithelzellen kommt es zu Expression von IL-8 (Hawn et al., 2003). Dieses aktiviert Neutrophile, Basophile und T-Zellen und ist in der frühen

3 Einleitung

Wirtsantwort auf Pathogene involviert (Jung et al., 1995, Eckmann et al., 1993, Mukaida et al., 1998). FlaA, das vermutlich über das Dot/Icm-System in das Zytosol der Wirtszelle gelangt, wird über das Naip5/Nlrc4-Inflammasom erkannt (siehe Kapitel 3.8.2) (Diez et al., 2003, Wright et al., 2003, Amer et al., 2006, Zamboni et al., 2006). Wichtig für die Erkennung ist hierbei die C-terminale Domäne von FlaA (Lightfield et al., 2008). *L. pneumophila*-Mutanten, die kein FlaA exprimieren, sind nicht in der Lage während der Makrophagen-Infektion in Mäusen Caspase-1 zu aktivieren (Molofsky et al., 2005, Ren et al., 2006, Amer et al., 2006). Weiterhin ist FlaA auch an der Aktivierung von Caspase-7 beteiligt (Akhter et al., 2009). Als Konsequenz können sich Flagellin-defiziente *Legionella*-Stämme besser in murinen Makrophagen vermehren, da sie der proinflammatorischen Antwort entgehen (Akamine et al., 2007). Ähnliche Ergebnisse konnten für humane Makrophagen und A549-Zellen gezeigt werden (Vinzing et al., 2008). In aktuellen Studien wurde FlaA in Kombination mit Mip und PilE rekombinant produziert und als mögliches Vakzin gegen *L. pneumophila* in Mäusen getestet. FlaA in dieser Kombination, aber auch als eigenständiges Protein, ist in der Lage eine hohe Immunogenität hervorzurufen (Mohabati Mobarez et al., 2017, He et al., 2017).

3.8 Wechselwirkung von *L. pneumophila* mit der angeborenen Immunabwehr

Als natürliche Wirte von *L. pneumophila* dienen üblicherweise Amöben (Al-Quadan et al., 2012). Dadurch sind Legionellen natürlicherweise nicht mit der humanen Immunabwehr konfrontiert und so weniger dem selektivem Druck ausgesetzt, das Erkennen durch die wirtseigene Immunabwehr zu verhindern. Somit spricht *L. pneumophila* eine Vielzahl an Erkennungsmechanismen der angeborenen und adaptiven Immunantwort an (Vance, 2010). In den folgenden Unterkapiteln werden die molekularen Mechanismen der durch eine *L. pneumophila*-Infektion ausgelösten, angeborenen Immunabwehr beschrieben (Abb. 3.10).

3.8.1 Toll-like receptors

Toll-like receptors (TLRs) sind Transmembranproteine der extrazellulären oder endozytotischen Vakuolen-Membran, die zu den *Pattern recognition receptors* (PRRs)

gehören und sogenannte PAMPs (*Pathogen-associated molecular patterns*) erkennen (Janeway and Medzhitov, 2002, Akira, 2006, Gazzinelli and Denkers, 2006). Dafür besitzen sie extrazelluläre, leucinreiche LRR-Sequenzen (*Leucine-rich repeats*) und eine intrazellulär vorliegende TIR-Domäne (*Toll/ IL-1R homology domain*), die mit den vier verschiedenen Adapterproteinen TRAM, MAL/TIRAP, MyD88 und TRIF interagieren kann und somit eine Signalkaskade in Gang setzt (O'Neill, 2008).

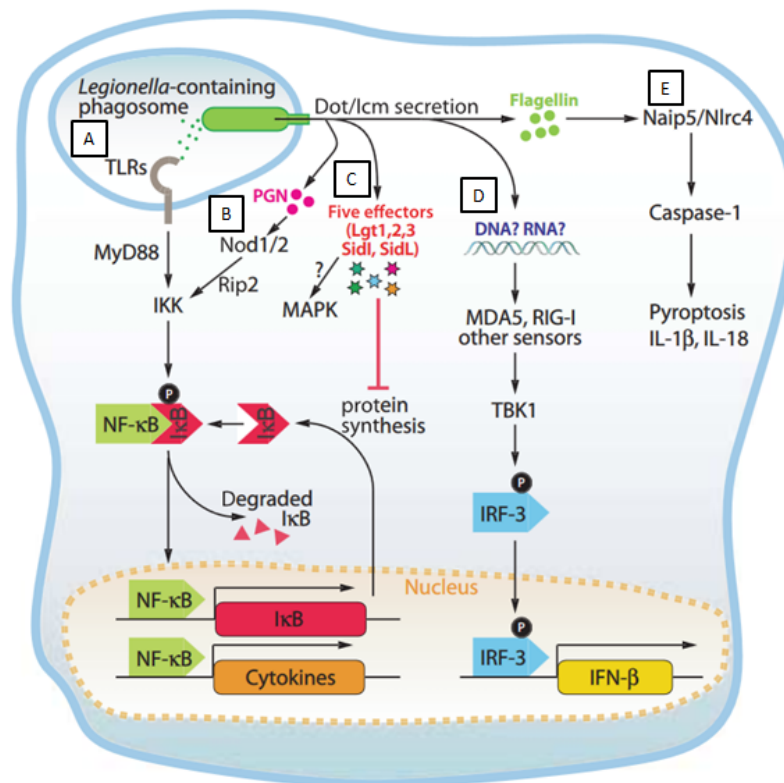


Abbildung 3.10: Schematische Darstellung der Erkennung von *L. pneumophila* durch das angeborene Immunsystem. (A) TLRs detektieren das Bakterium auf der Zelloberfläche oder im Phagosom. Die Signalweiterleitung erfolgt über das Adapter-Protein MyD88. Durch die Sezernierung von Effektormolekülen durch das Dot/Icm-Sekretionssystem können im Zytosol der Wirtszelle weitere Erkennungswege angesprochen werden. (B) Zusätzlich stimuliert *Legionella* die Rezeptoren NOD1 und NOD2, wobei Rip2 als Adapter-Protein dient. TLR- und NOD-vermittelte Detektion resultiert in der Aktivierung proinflammatorischer Transkriptionsfaktoren wie NF-κB. NF-κB induziert dabei auch die Expression des eigenen Inhibitors IκB. (C) Legionellen sezernieren fünf verschiedene Effektoren (Lgt1, Lgt2, Lgt3, SidI und SidL), die die Protein-Synthese dieses Inhibitors blockieren können. Weiterhin aktivieren sie wirtseigene MAPKs (*Mitogen-activated protein kinases*). (D) Über Nukleinsäuren induziert *L. pneumophila* IRF3-Aktivierung und die Transkription von Typ I-Interferonen (IFNs). (E) Zytosolisches Flagellin wird über das Naip5/Nlrc4-Inflammasom detektiert und führt zu einer Caspase-1-Aktivierung, der Sekretion von Zytokinen und schlussendlich zur Lyse der Wirtszelle (Fontana and Vance, 2011).

3 Einleitung

Im Gegensatz zu vielen anderen Bakterien wird *L. pneumophila* nicht über TLR4, einem generellen LPS-Sensor, erkannt (Zamboni et al., 2004). Stattdessen haben Studien gezeigt, dass das Lipid A von Legionellen, über welches das LPS in der Membran verankert ist, durch TLR2 detektiert wird und zur Expression des hauptsächlich auf Monozyten und Makrophagen präsenten Oberflächenproteins CD14 führt. Daher wird vermutet, dass das *Legionella*-LPS durch TLR2 erkannt wird. Jedoch sind die genauen Mechanismen bis jetzt unklar (Girard et al., 2003). Weiterhin spielt TLR2 auch eine Rolle bei der Erkennung von weiteren *L. pneumophila*-PAMPs wie Lipopeptiden und Lipoproteinen. Die Aktivierung des Rezeptors ist dabei kritisch für die Infektion von *L. pneumophila* in Mäusen. So konnte gezeigt werden, dass *tlr2*^{-/-}-Mäuse eine verringerte Zytokinproduktion aufweisen und die Bakterien sich besser in der Lunge vermehren können (Akamine et al., 2005, Archer and Roy, 2006, Hawn et al., 2006). Als flagellierte Bakterien können Legionellen weiterhin über den Rezeptor TLR5 erkannt werden. In Menschen konnte gezeigt werden, dass ein spezieller Polymorphismus in der Liganden-Bindedomäne von TLR5 zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber der Legionärskrankheit führt (Hawn et al., 2003). Diese Ergebnisse konnten durch Versuche mit *tlr5*^{-/-}-Mäusen gestützt werden, die nach *L. pneumophila*-Infektion eine veränderte proinflammatorische Antwort zeigten (Hawn et al., 2007).

Ein weiterer wichtiger PRR bei der Infektion mit *L. pneumophila* ist TLR9. Mäuse, die diesen Rezeptor nur in geringen Mengen exprimieren, weisen bei Legionelleninfektionen reduzierte Zytokinlevel auf, was die Replikation des Erregers in den Lungen begünstigt (Newton et al., 2007a, Archer et al., 2009). TLR9-defiziente Mäuse zeigten außerdem Defekte bei der Phagozytose von Legionellen durch alveolare Makrophagen und eine erhöhte Sterblichkeitsrate bei einer Infektion im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (Bhan et al., 2008). Das allgemeine Adapter-Protein für die meisten TLRs ist MyD88, welches eine wichtige Rolle bei der Signalweiterleitung nach Aktivierung des Rezeptors spielt. Eine Deletion dieses Proteins in dem Wirtsorganismus führt zu einer hohen Anfälligkeit gegenüber einer Infektion. MyD88-defiziente Mäuse zeigten bei einer pulmonaren Infektion mit *L. pneumophila* eine beeinträchtigte Cytokin-Produktion und stark erhöhte *Legionella*-CFUs (*colony forming units*) in der Lunge (Neild et al., 2005, Archer and Roy, 2006, Hawn et al., 2006, Sporri et al., 2006, Archer et al., 2010). Da MyD88 das Adapter-Protein für TLRs ist wurde vermutet, dass eine Deletion mehrerer TLRs zu einer ähnlich hohen Anfälligkeit gegenüber *Legionella*-Infektionen führt wie bei MyD88-defizienten Mäusen. Diese Annahme konnte

konnte jedoch in Versuchen mit *tlr5^{-/-}/tlr9^{-/-}*-, *tlr2^{-/-}/tlr5^{-/-}*- oder *tlr2^{-/-}/tlr9^{-/-}*-Mäusen nicht bestätigt werden (Archer et al., 2009). Vermutlich gibt es für die Detektion von *L. pneumophila*-Strukturen noch eine Vielzahl an weiteren, bisher nicht identifizierten Mechanismen (Abb 3.10 A).

3.8.2 NOD-like receptors

Eine weitere Familie innerhalb der PRRs sind die sogenannten *NOD-like receptors* (NLRs). Die zentrale NOD (Nukleotid-bindende und Oligomerisierungs-Domäne) enthält eine NACHT-Domäne (NAIP, CIITA, HET-E und TP-2), welche in dNTPase-Aktivität und Oligomerisierung involviert ist (Koonin and Aravind, 2000, Ting et al., 2008). Die C-terminale LRR-Domäne dient der Liganden-Bindung, während die N-terminale Effektor-Domäne mit anderen Proteinen interagiert und eine Signalkaskade in Gang setzt. Die N-terminale Domäne kann dabei aus einer *Acidic transactivation domain* (NLRA), einer *Baculoviral inhibitory repeat-like domain* (BIR, NLRB), einer *Caspase activation and recruitment domain* (CARD, NLRC) oder einer Pyrin-Domäne (NLRP) bestehen (Ting et al., 2008). Erste Versuche zu den NLRs Nod1 und Nod2, welche allgemein bakterielles Peptidoglykan erkennen, im Zusammenhang mit *Legionella*-Infektionen in Makrophagen wurden von Shin et al. im Jahr 2008 durchgeführt. Dabei wurden die durch Effektoren des Dot/Icm-System der Legionellen induzierten Gene der Makrophagen untersucht. In dieser Studie wurden einige Gene identifiziert, die im Zusammenhang mit einem Rip2-abhängigen Signalweg stehen, was auf eine Detektion durch Nod1 und Nod2 hindeutet. Der Einfluss dieses Erkennungsweges wurde durch *in vivo* Experimente mit *rip2^{-/-}/myd88^{-/-}*- und *myd88^{-/-}*-Mäusen analysiert, wobei erstere eine deutlich höhere Anfälligkeit für *L. pneumophila*-Infektionen, auch bei geringen MOIs, aufwiesen (Archer et al., 2010). Jedoch zeigten diese und weitere Studien auch, dass die Rekrutierung von Neutrophilen zwar teilweise von Nod1 und Nod2 abhängig ist, die Replikation von *L. pneumophila* aber nur geringfügig durch diesen Signalweg beeinträchtigt wird (Abb. 3.10 B) (Berrington et al., 2010, Frutuoso et al., 2010).

Schon in früheren Versuchen von Yamamoto et al. im Jahr 1988 wurde festgestellt, dass Makrophagen von A/J-Mäusen, im Gegensatz zu anderen Maus-Stämmen, die Replikation von *L. pneumophila* nicht einschränken können. Später zeigte sich, dass das für die *L. pneumophila*-Resistenz der Mausstämme verantwortliche Gen *naip5*, auch als *birc1e* bezeichnet, auf dem autosomal-rezessiven Locus *Lgn1* auf Chromo-

3 Einleitung

som 13 liegt (Beckers et al., 1995, Dietrich et al., 1995, Diez et al., 2003, Wright et al., 2003). Naip5 steht im Zusammenhang mit der Caspase-1-Aktivierung und ist abhängig von einem funktionierenden Dot/Icm-System. Jedoch benötigt dieser Signalweg noch ein weiteres NLR-Protein, das sogenannte Nlrc4 (Ipaf) (Amer et al., 2006, Molofsky et al., 2006, Zamboni et al., 2006). Der Agonist für das Naip5/Nlrc4-Inflammasom ist das *Legionella*-Flagellin FlaA. Legionellen, die defizient für *flaA* sind, werden durch die Rezeptoren nicht erkannt und entgehen diesem Signalweg (Molofsky et al., 2006, Ren et al., 2006, Zamboni et al., 2006). Das Flagellin wird von Naip5 und Nlrc4 über seine C-terminale Domäne erkannt, welche für die TLR5-abhängige Detektion nicht relevant ist (Lightfield et al., 2008). Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass Naip5 wichtig für die Erkennung der N-terminalen Domäne von FlaA ist und dabei eine regulatorische Rolle bei der Aktivierung von Nlrc4 übernimmt. Bei anderen Bakterienspezies wie *Salmonella enterica* spielt Naip5 dagegen eine untergeordnete Rolle (Lightfield et al., 2011). Die Aktivierung des Naip5/Nlrc4-Inflammasoms führt zu der Caspase-1-abhängigen Ausbildung von Poren in der Makrophagen-Membran und letztendlich zur Pyroptose der Wirtszelle (Derre and Isberg, 2004, Case et al., 2009, Silveira and Zamboni, 2010, Whitfield et al., 2010). Weiterhin werden die Transkriptionsregulatoren Irf1 und Irf8 aktiviert und es kommt Caspase-1 bedingt zur Sekretion der Zytokine IL-1 β und IL-18 (Abb. 3.10 E) (Fortier et al., 2009, Sahoo et al., 2011).

3.8.3 Das Asc-Inflammasom

Das Adapter-Protein *Apoptosis-associated speck-like protein containing CARD* (Asc) besteht aus einer Pyrin- und einer CARD (*Caspase recruitment domain*)-Domäne. Asc bildet mittels CARD/CARD-Interaktion eine Vernetzung zwischen Caspase-1 und den Pyrin-haltigen Molekülen der NALP/NLRP-Familie (Mariathasan et al., 2004). Versuche mit Makrophagen aus Asc-defizienten Mäusen haben gezeigt, dass das Adapter-Protein zwar wichtig für die Sekretion von IL-1 β als Antwort auf eine *L. pneumophila*-Infektion ist, jedoch keine Rolle bei der Kontrolle der Replikation des Erregers in C57BL/6-Makrophagen spielt (Molofsky et al., 2006, Ren et al., 2006, Zamboni et al., 2006). Daher wurde erst vermutet, dass Asc an der Naip5/Nlrc4-abhängigen Caspase-1-Aktivierung beteiligt ist. Jedoch zeigten spätere Versuche, dass der Asc-Signalweg unabhängig von Nlrc4 ist. Weiterhin geschieht die Caspase-1-Aktivierung auch unabhängig von Nalp3. Der genaue Mechanismus der Asc-vermittelten Aktivierung durch *L. pneumophila* ist jedoch bis heute unklar (Case et al., 2009). Im Gegensatz zu Maus-

Makrophagen scheint Asc bei humanen Monozyten eine wichtige Rolle bei der Regulierung der *L. pneumophila*-Infektion zu spielen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Legionellen die Expression von Asc aktiv reprimieren können (Abdelaziz et al., 2011).

3.8.4 RIG-I-like receptors

RIG-I-like receptors (RLRs) gehören zur Familie der DExX/H-Box RNA-Helikasen und fungieren als zytoplasmatische Sensoren von PAMPs wie RNA (Onoguchi et al., 2011). Die RLRs RIG-I und MDA5 wurden ursprünglich im Zusammenhang mit der Detektion viraler RNA gefunden. RIG-I erkennt generell 5'-phosphorylierte *blunt*-Enden der viralen dsDNA, wohingegen MDA5 unspezifisch innerhalb langer dsRNA bindet. Beide Moleküle besitzen neben der DExD/H-Box-Helikase noch CARDs und eine C-terminale Domäne (Kato et al., 2006, Pichlmair et al., 2006). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass RLRs auch wichtig bei der Immunantwort in Reaktion auf bakterielle Infektionen sind und sowohl RIG-I als auch MDA5 bei der Typ-I Interferon (IFN)-Produktion bei *L. pneumophila*-Infektionen beteiligt sind (Opitz et al., 2006, Stetson and Medzhitov, 2006, Monroe et al., 2009). Die Produktion von Typ-I IFN hängt bei einer Infektion mit Legionellen von den Molekülen MAVS (*Mitochondrial antiviral signaling protein*) und IRF3 ab (Opitz et al., 2006, Monroe et al., 2009). Die IRF3-abhängige Immunantwort ist dabei unabhängig von dem Naip5/Nlrc4-System und kommt sowohl in Mäusen als auch in Menschen vor (Coers et al., 2007, Lippmann et al., 2008). Jedoch wird dafür ein funktionierendes Dot/Icm-System und die Anwesenheit von bakterieller DNA im Wirtszell-Zytoplasma benötigt. Vermutlich gelangt die Legionellen-DNA über das Typ-IV-Sekretionssystem in die Wirtszelle (Stetson and Medzhitov, 2006). Dabei wird über RIG-I nur RNA von *L. pneumophila* detektiert, keine DNA (Monroe et al., 2009). Eine weitere Studie zeigte, dass eine RNA-Polymerase III, die Poly(dA:dT)-DNA in 5'-ppp-RNA umwandelt, wichtig für die IFN β -Induktion mittels RIG-I-Signalweg ist. Für die Aufklärung der genauen Mechanismen der DNA- und RNA-Detektion sind noch weitere Untersuchungen notwendig. Jedoch haben die bisherigen Versuche gezeigt, dass der Typ-I IFN-Signalweg die Replikation der Legionellen in Phagozyten effektiv einschränkt und daher von großer Relevanz für die Makrophagen ist (Abb. 3.10 D) (Chiu et al., 2009, Monroe et al., 2009).

3.9 Zielsetzung der Arbeit

Die Zink-Metalloprotease ProA gehört zu den ersten in *L. pneumophila* entdeckten Proteinen und gilt als eines der am vielseitigsten untersuchten Faktoren. Eine Assoziation der Protease mit der Virulenz des Lungenpathogens wurde bereits frühzeitig vermutet. Jedoch führten einige Versuche bisher zu kontroversen Ergebnissen und viele Funktionen von ProA sind bis heute nicht geklärt. In dieser Arbeit sollte daher die Rolle der meist sezernierten Protease von *L. pneumophila* durch Untersuchung verschiedener Teilaspekte genauer charakterisiert werden.

Im ersten Teil der Arbeit war die Produktion und Reinigung der Protease zu optimieren. Einerseits sollte damit reines Protein für die genauere Untersuchung der Proteinfunktion gewonnen werden. Ferner war das langfristige Ziel, die bisher unbekannte Kristallstruktur von ProA zu lösen. Dafür war das Protein sowohl nativ aus *L. pneumophila* als auch rekombinant aus *E. coli* zu isolieren. Für die rekombinante Produktion und Reinigung sollten verschiedene Verfahren getestet werden, um größere Mengen an reinem Protein zu erhalten und erste Tests zur Kristallisation durchzuführen.

Das Ziel des zweiten Teils dieser Arbeit war die phänotypische Charakterisierung der Zink-Metalloprotease. Dafür musste zunächst eine *proA*-Deletionsmutante erstellt werden. In weiteren Versuchen sollte untersucht werden, welchen Einfluss ProA auf das Wachstumsverhalten sowie das Sekretom in Voll- und Minimalmedium, die *Sliding Motility* und die Infektion verschiedener Wirtszellen sowie humaner Lungengewebsexplantate hat. Weiterhin waren die phänotypischen Eigenschaften von Deletionsmutanten der bisher nicht charakterisierten Peptidasen LpC_0267 und PepN zu analysieren. Das Ziel des dritten Teils dieser Arbeit war die Untersuchung der genauen Funktion von ProA und möglicher Auswirkungen auf die proinflammatorische Antwort des Wirts. Dafür sollte überprüft werden, ob ProA das immunstimulierende Flagellin von *L. pneumophila* degradieren kann und welche Effekte dies möglicherweise auf die damit verbundene Detektion und Immunantwort durch die Wirtszelle hat.

4 Material und Methoden

Die folgenden Unterkapitel beschreiben die in dieser Arbeit verwendeten Geräte, Materialien und angewandten Methoden.

4.1 Geräte

Die für die Experimente verwendeten Geräte sind in Tabelle 4.1 aufgeführt.

Tabelle 4.1: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller	Typ
Absaugpumpe	Gilson	Safe Aspiration station
Autoklav	Zirbus Technology	LVSA 50/70
Automatisches Chromatographie-System	GE Healthcare	ÄKTAFPLC
Automatisches Imaging-System für Proteinkristallisation	Formulatrix	Rock Imager 1000
Automatische Pipette	Brand	Handy Step® electronic
Automatisches Pipettiersystem für Kristallisationsplatten	Zinsser Analytic	HoneyBee X8
CO ₂ -Inkubator	Sanyo	MCO-18 AIC (UV) MIR-253
DNA-Gelkammer	GP Kunststoff-technik	Mini Midi-Large
	BioRad	Wide Mini-Sub Cell GT
Eismaschine	Icematic	F200
Elektroblot	BioRad	Trans-Blot® Turbo
Feinwaage	Sartorius	TE 2145
French Press	Thermo	French Pressure Cell Press
FPLC-Säulen	GE Healthcare	HisTrap™ HP HisTrap® Octyl FF HiLoad® 16/600 Superdex® 200 pg

4 Material und Methoden

Fraktionssammler	Amersham Biosciences	Fraction Collector Frac-950
Geldokumentationsanlage	DC Science Tec	DeVision G
Homogenisator	Polytron	PT2500E
Inverses Lichtmikroskop	ZEISS	Axiovert 35M
Magnetrührer	IKA	RH basic 2
Manuelle Einkanalpipetten	Rainin	Pipet-Lite XLS
	Brand	Transferpette S
Manuelle Multikanalpipetten	Rainin	Pipet-Lite XLS
Massenspektrometrie	Thermo Scientific	LTQ Orbitrap™ XL
Mikrovolumen UV/VIS-Spektrophotometer	Peqlab	ND-1000
pH-Meter	Schott Instruments	Lab 850
Power supply	Peqlab	EV222 EV231
	BioRad	PowerPac™ Basic
Reagenzgefäßschüttler	Scientific Industries	Vortex Genie 2
Reinstwasseranlage	Millipore	MilliQ Synthesis A10
Schüttelgeräte	Grant-Bio	PMR-30
	IKA	KS 130 basic
SDS-Gelkammer	Biorad	Mini-Protean Tetra Cell
Sicherheitswerkbank	Thermo Scientific	Hera Safe
SpeedVac	Eppendorf	Concentrator 5301
Spektralphotometer	Biochrom	Libra S22
Standardwaage	Sartorius	BL 1500
Tiefkühlschrank -80 °C	Sanyo	MDF U73V
Thermoblock	Eppendorf	5424
	Peqlab	Thriller
Ultrazentrifuge	Beckman Coulter	Optima™ L-90K Ultracentrifuge
Wasserbad	GFL	1002
Zentrifugen	Eppendorf	Mini-spin

Zentrifugen	Beckman Coulter	Allegra X-12R
	Sigma	2K15C

4.2 Verbrauchsmaterialien

Die für die Experimente verwendeten allgemeinen Verbrauchsmaterialien wie Einmal-küvetten, Kryoröhrchen, Pipettenspitzen für Ein- und Mehrkanalpipetten, Reaktionsgefäße, serologische Pipetten, sterile Spritzen und Sterilfilter wurden von unterschiedlichen Firmen wie z.B. BD Falcon, Brand, Eppendorf, Greiner bio-one und Sarstedt bezogen. Chemikalien stammen von Firmen wie GE Healthcare, Invitrogen, Merck, Oxoid, Roth und Sigma-Aldrich. In Tabelle 4.2 sind spezielle Verbrauchsmaterialien aufgeführt.

Tabelle 4.2: Spezielle Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Amicon Ultra-15 Zentrifugal-Filtereinheiten	Merck Millipore (UFC 903008)
Azocasein	Sigma (11610-5G)
Chelating Sepharose™ Fast Flow	GE Healthcare (17057501)
Dialysierschlauch MWCO 14 kDa	Roth (1785.1)
DMEM	PAA (E15-005)
Fetal Calf Serum (FCS)	Biochrom (S0415)
InstantBlue™	Expedeon (ISB 1L)
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	Sigma
L-Glutamin	PAA (M11-004)
Multiwellplatten 96 Wells	Sarstedt (82.1582.001), unbehandelt TPP (92424), unbehandelt
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Sigma-Aldrich (P8139)
Phytinsäure (Phytat)	Sigma-Aldrich
Petrischale, quadratisch, 120x120 mm	Greiner Bio-One (688161)
Protino® Ni-TED Säulen	Macherey-Nagel
PVDF/Immobilon®-P Transfer Membrane	Merck Millipore (IPVH0010; 0,45 µm)

4 Material und Methoden

Roti®-Nanoquant	Roth
RPMI 1640 mit L-Glutamin	GE Healthcare (SH30027.01)
Vivaspin® 20 mL Zentrifugal-Filtereinheiten	Sartorius (VS0201, VS2002)
Zählkammer „Fuchs-Rosenthal“	Assistant
Zellkulturflaschen 25 cm ²	BD Falcon (353108)
Zellkulturflaschen 75 cm ²	TPP (90076)
13 mL Röhrchen mit Rundboden	Sarstedt (62.515.006)

In Tabelle 4.3 sind die verwendeten Antibiotika aufgeführt.

Tabelle 4.3: Antibiotika

Bezeichnung	Hersteller	Stocklösung	Aufbewahrung
Ampicillin	Roth	100 mg/ mL in H ₂ O	-20°C
Chloramphenicol	Fluka	34 mg/ mL in EtOH	-20°C
Gentamicin	PAA	10 mg/ mL in H ₂ O	4°C
Kanamycin	Roth	40 mg/ mL in H ₂ O	-20°C
Polymyxin B	Sigma	50 mg/ mL in H ₂ O	4°C
Blasticidin	InvivoGen	10 mg/ mL in HEPES	-20°C
Zeocin TM	InvivoGen	100 mg/ mL in HEPES	-20°C

4.3 Zellen, Bakterienstämme, Antikörper, Enzyme, Oligonukleotide, kommerzielle Kits, Vektoren, Software und Datenbanken

Die Tabelle 4.4 zeigt die für die verschiedenen Infektions- und Proinflammationsstudien verwendeten eukaryotischen Zellen und Zelllinien.

Tabelle 4.4: Verwendete Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	Axenischer Stamm	ATCC 30234

HEK-Blue™ hTLR5	SEAP Reporter 293-Zellen, exprimieren humanes TLR5-Gen	InvivoGen (hkb-hltr5)
THP-1	Humane leukämische Mono- zyten, Lymphomzelllinie	ACC16, DSMZ
<i>Vermamoeba vermiformis</i>	Axenischer Stamm	ATCC 50237

In Tabelle 4.5 sind die in dieser Arbeit verwendeten und hergestellten Bakterienstämme aufgeführt.

Tabelle 4.5: Verwendete Bakterienstämme

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH10 β	<i>F- andA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL ΔlacX74 Φ80lacZ ΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ (mrrhsdRMS-mcrBC)λ-Smr</i>	InvitroGen
<i>Escherichia coli</i> BL21	<i>fhuA2 [lon] ompT gal [dcm] ΔhsdS</i>	New England Biolabs
<i>Escherichia coli</i> BL21- pET22b(+)- <i>proA</i>	<i>fhuA2 [lon] ompT gal [dcm], ΔhsdS, proA kloniert in pET22b(+) mit NdeI und XhoI, Amp^r</i>	Diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> BL21- pET22b(+)-ProA(Δ 25- 207_ E378N)	<i>fhuA2 [lon] ompT gal [dcm], ΔhsdS, ProA(Δ25-207_ E378N) kloniert in pET22b(+) mit NdeI und XhoI</i>	Diese Arbeit (Scheithauer, 2016)
<i>Escherichia coli</i> XL10 Gold	<i>endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 tetR Δ(F[proAB lacI_qZΔ M15 Tn10(TetR Amy CmR)]</i>	Stratagene

4 Material und Methoden

<i>Legionella pneumophila</i> Corby	WT, Rif ^r	Jepras et al. (1985)
<i>Legionella pneumophila</i> Corby $\Delta dotA$	<i>dotA::nptI</i> ; Km ^r	Diese Arbeit
<i>Legionella pneumophila</i> Corby $\Delta proA$	<i>proA::nptI</i> ; Km ^r	Diese Arbeit
<i>Legionella pneumophila</i> Corby $\Delta flaA$	<i>flaA::nptI</i> ; Km ^r	Dietrich et al. (2001)
<i>Legionella pneumophila</i> Corby ΔLpC_0267	<i>LpC_0267::nptI</i> ; Km ^r	Diese Arbeit
<i>Legionella pneumophila</i> Corby $\Delta pepN$	<i>pepN::nptI</i> ; Km ^r	Diese Arbeit (Schürer, 2015)

In Tabelle 4.6 sind die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide mit den entsprechenden Schmelztemperaturen aufgezeigt.

Tabelle 4.6: Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz	T _m
2876_fw	TTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAATTCA TTTTATTGATTGATAAAATTCAGC	59,2 °C
2876_rv	CTTCCCCAAAAACCAGTAAAGC	60,0 °C
KmPr_fw	CACGTTGTGTCTCAAAATCTCTG	60,9 °C
NptI_R	TTAGAAAACTCATCGAGCATCAAAT	60,1 °C
ProAseq_fw	TGATTTGGATCATCCTTAATTTTGCA	60,0 °C
proA_fw	AGGAGACATATGCACCCAAATTATTATT TGTCACC	70,6 °C
proA_rev	AGGAGACTCGAGATCGACATAACAAGAT TGATAATTTATAGTC	74,2 °C
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	54,3 °C

T7 Terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	57,5 °C
M13_For	GTAAAACGACGGCCAGT	52,4 °C
M13_Rev	GGAAACAGCTATGACCATG	55,2 °C
2877_UFF	CTGCGAGGATATCGGCAAG	59,5 °C
2877_UFR	GTTTCCCGTTGAATATGGCTCATTGATT CTAACTCCTTAAACTAAATTC	58,4 °C
2877_DFF	TTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAAATTC ATTTTATTGATTGATAAAATTCAGC	59,2 °C
2877_DFR	CTTCCCCAAAAACCAGTAAAGC	60,1 °C
ProA_seq_F1	ATGGACGGTTCTCGGGAG	58,4 °C
ProA_seq_F2	GGTTGCCGCATTGACTGAC	59,5 °C
ProA_seq_R	CAGTATAATGGTAATAGGATTAATG	57,6 °C
ProA_seq_F3	GGCCGTAAATAATGGAGTGGA	59,5 °C
ProA_seq_F4	CTTCTTTATGCAATGTTTCCCG	58,4 °C
ProA_seq_F5	CGGAGCGGGCAAGAGCA	59,8 °C
LpCDotA_UFF	TTTTACTGAGATACGTTGATAGACG	60,9 °C
LpCDotA_UFR	ACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATTC TTTCTCACCCAATAACCCTTG	65,3 °C
LpCDotA_DFF	ATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAAC CACCTCCTGAATAACATTCTAAA	60,3 °C
LpCDotA_DFR	CCAAGGTCGAGGCAAAAAAGG	61,2 °C
DotA_seq_F	TTCCACACTTTCCATAAAAGTG	56,4 °C
DotA_seq_R	GCTGCAGTTCTCATTTACTG	56,4 °C
NptI_Fa	ATGAGCCATATTCAACGGGAAAC	60,9 °C
NptI_R	TTAGAAAAACTCATCGAGCATCAAAT	60,1 °C
aacC1_F	ATGTTACGCAGCAGCAACGATG	62,1 °C
aacC1_R	TTAGGTGGCGGTACTTGGGT	60,5 °C
3095_UFF	GGTTGCCAAAACACATCTAGC	59,5 °C
3095_DFR	TCCACACCTTCTGCAGGTC	59,5 °C
3095_Bam_F	CATGGATCCGTCTGGCATAGTCATTG CTTC	56,3 °C
3095_Kpn_R	GTAGGTACCGAAAAATAGGATGAATT AAAGTGTGC	61,7 °C

4 Material und Methoden

aacC1_Bam_F	CATGGATCCATGTTACGCAGCAGCAA CGATG	62,1 °C
aacC1_Kpn_R	GTAGGTACCTTAGGTGGCGGTACTTG GGT	57,3 °C
3095_seq_pepN2	CACAGAAGGGCTTTCAGCTATT	60,1 °C
3095_seq_DK_P1	CAAGCCTTCTCGACTCAAACAA	60,1 °C
0267_UFF	CCGGTTTATGATTAGCCAACAAA	59,2 °C
0267_UFR	GTTTCCCGTTGAATATGGCTCATAAA ATGAAATCCATTCAAAGAATTAAGC	59,9 °C
0267_DFF	TTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAAGC ATGATTTTTCCAGTTGGGG	59,5 °C
0267_DFR	AAAATGAAGGGGATATCTTTGTCTC	60,9 °C
0267_seq_F1	ACATCCTTATACTCAATCGATTGAT	59,2 °C
0267_seq_F2	GATGACACATTCGTTTGTGACG	60,1 °C
0267_seq_R1	ACGATCCTGATATGATTCTACCC	60,9 °C
0267_seq_R2	ATTAGATGCCTGATTGACAAGACT	60,3 °C

In Tabelle 4.7 sind die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme sowie die Bezugsquellen aufgezeigt.

Tabelle 4.7: Verwendete Restriktionsenzyme

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
NdeI	Isoliert aus <i>E. coli</i> -Stamm mit <i>ndeI</i> -Gen von <i>Neisseria denitrificans</i> (NRCC 31009), Schnittstelle: CA/TATG	New England Biolabs
XhoI	Isoliert aus <i>E. coli</i> -Stamm mit <i>xhoI</i> -Gen von <i>Xanthomonas holcicola</i> (ATCC 13461), Schnittstelle: C/TCGAG	New England Biolabs
KpnI-HF™	Isoliert aus <i>E. coli</i> -Stamm mit <i>kpnI</i> -Gen von <i>Klebsiella pneumoniae</i> OK8 (ATCC 49790) Schnittstelle: GGTAC/C	New England Biolabs

BamHI-HF™	Isoliert aus <i>E. coli</i> -Stamm mit <i>bamHI</i> -Gen von <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H (ATCC 49763), Schnittstelle: G/GATCC	New England Biolabs
-----------	--	---------------------

Die Abbildung 4.1 zeigt die verwendeten DNA- und Protein-Größenstandards.

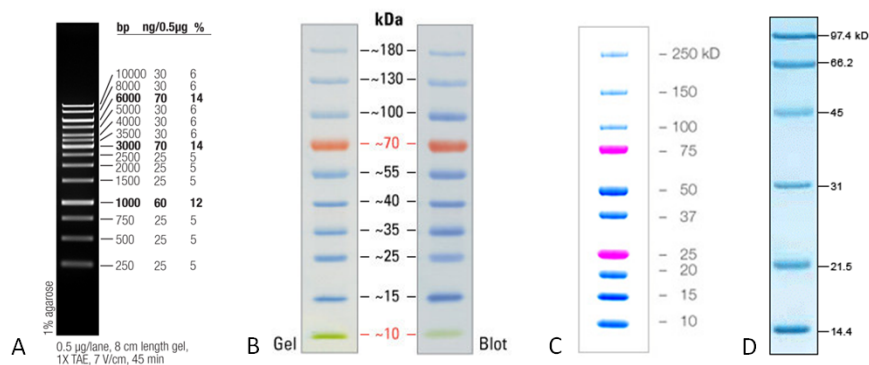


Abbildung 4.1: Verwendete DNA- und Protein-Größenstandards. (A) GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), (B) PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific), (C) Precision Plus Protein™ Dual Color Standard (BioRad), (D) Unstained Natural Low Range Protein Standard (BioRad).

Die Tabelle 4.8 zeigt die verwendeten Antikörper.

Tabelle 4.8: Verwendete Antikörper

Bezeichnung	Beschreibung	Referenzen
Mouse anti-His	IgG2a, bindet an Histidinreiche Sequenzen wie His6-Tag	GE Healthcare
Mouse anti-ProA	(PHK101-D5) scFv-mFc, bindet spezifisch an ProA von <i>L. pneumophila</i>	Philipp Kuhn, 2015, Inst. f. Biotechnologie, TU Braunschweig
Rabbit anti-FlaA	Polyklonal, bindet spezifisch an FlaA von <i>L. pneumophila</i>	Heuner et al., 1995
Goat anti-Mouse Alkalische Phosphatase Konjugat	IgG, Sekundärantikörper alkalische Phosphatase gekoppelt	Thermo Fisher Scientific

4 Material und Methoden

Goat anti-Rabbit Alkalische Phosphatase Konjugat	IgG, Sekundärantikörper, alkalische Phosphatase gekoppelt	Thermo Fisher Scientific
--	---	--------------------------

In Tabelle 4.9 sind die verwendeten Vektoren aufgelistet.

Tabelle 4.9: Vektoren

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
pGEM®-T Easy Vector	Linearisierter Vektor mit 3'-terminalen Thymidin-Überhängen an beiden Enden, T7 und SP6 RNA-Polymerase Promotor, α -Peptid von β -Galactosidase, Amp ^r	Promega
pET-22b(+)	T7 RNA-Polymerase Promotor, N-terminales <i>pelB</i> -Signal, C-terminaler His-Tag, Amp ^r	Novagen

In Tabelle 4.10 sind die verwendeten kommerziellen Kits aufgeführt.

Tabelle 4.10: Kommerzielle Kits

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
QIAquick PCR Purification Kit	Aufreinigung von Einzel- und Doppelstrang-DNA-Fragmenten nach PCR und anderen enzymatischen Reaktionen	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Isolierung von Einzel- und Doppelstrang-DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Isolierung von Plasmid- oder Cosmid-DNA	Qiagen
pGEM®T-Easy Vector System I	System zum Klonieren von PCR-Produkten	Promega
Rapid DNA Ligation Kit	Schnelle <i>sticky</i> - oder <i>bluntend</i> DNA-Ligation	Thermo Fisher Scientific
DuoSet® Human CXCL8/IL-8 ELISA Kit	Kit für Sandwich-ELISA zur Bestimmung von nativem und rekombinantem humanen Interleukin 8	R&D Systems

HEK-Blue™ Detection Kit	Zur Detektion von sezernierter alkalischer Phosphatase (SEAP)-Expression	InvivoGen
----------------------------	---	-----------

Die Tabelle 4.11 zeigt die verwendeten Softwareprodukte und Datenbanken.

Tabelle 4.11: Software und Datenbanken

Software	Quelle
NCBI BLAST®	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
SignalP 4.0 Server	https://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
Peptide Property Calculator	http://biotools.nubic.northwestern.edu/proteincalc.html
PSORTb 3.0.2	http://www.psort.org/psortb/
OligoCalc	http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html
GraphPad Prism 5	GraphPad Software
Adobe Photoshop 7.0.1	Adobe Systems Software
R Studio 3.2.1	Comprehensive R Archive Network (CRAN)
Lasergene™ 7	DNASTAR
AIDA Image Analyzer 5.1	Raytest
KEGG GENES	http://www.genome.jp/kegg/genes.html
MEROPS Database	https://www.ebi.ac.uk/merops/

In Abbildung 4.2 sind die verwendeten Vektoren dargestellt.

4 Material und Methoden

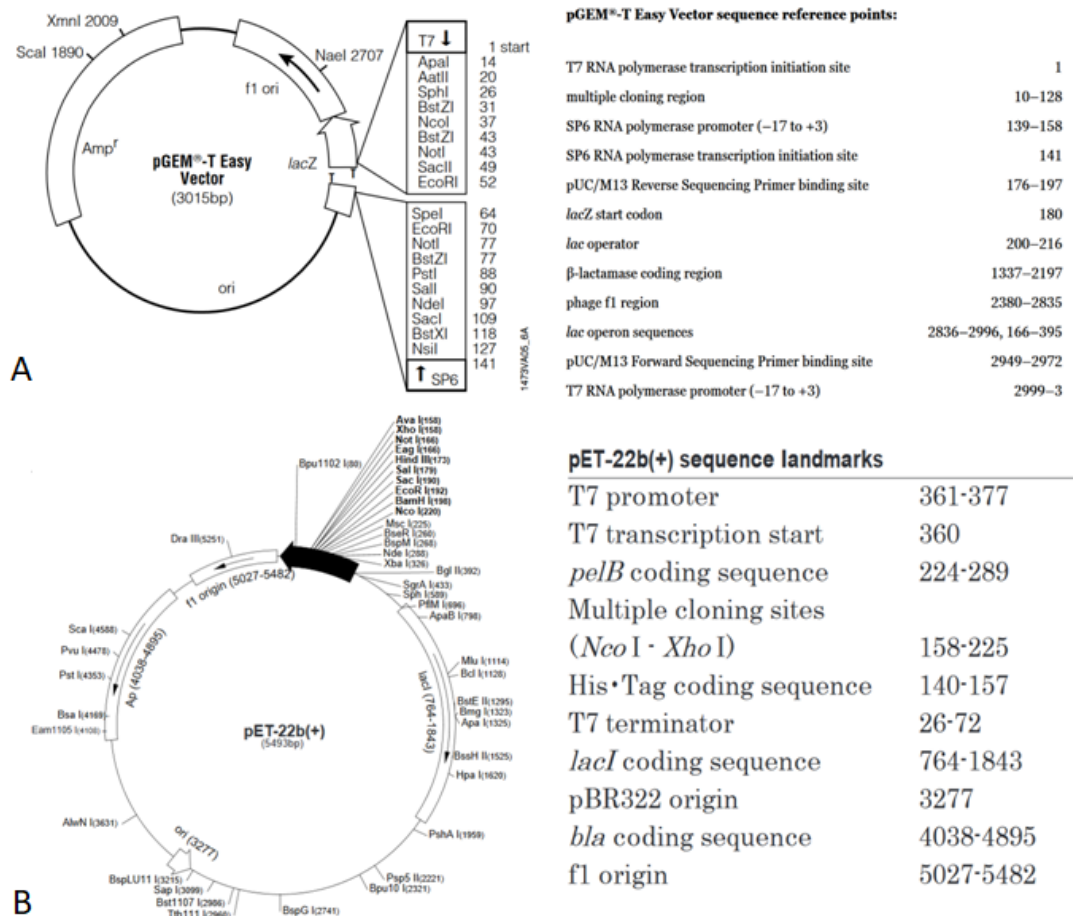


Abbildung 4.2: Vektorkarten der verwendeten Plasmide. (A) pGEM®-T Easy von Promega (www.promega.com), (B) pET-22b(+) von Novagen (www.novagen.com)

4.4 Bakteriologische Methoden

In den folgenden Unterkapiteln werden die bakteriologischen Methoden, die in dieser Arbeit angewandt wurden, näher beschrieben.

4.4.1 Kultivierung von Bakterien

Für die Kultivierung von *L. pneumophila* Corby und seiner Mutanten wurden *Buffered Charcoal Yeast Extract* (BCYE)-Agarplatten verwendet und die Bakterien bei 37 °C und 5 % CO₂ für 3-4 Tage inkubiert (Tab. 4.12). Flüssigkulturen wurden in *Yeast Extract Broth* (YEB)-Medium (YEB), bzw. chemisch-definiertem Medium (CDM) bei 37 °C und 200 rpm kultiviert (Tab. 4.13-4.14). Bei Bedarf wurden die Medien mit

20 µg/mL Kanamycin oder 10 µg/mL Gentamicin versetzt. Zur Vermeidung von Sontanmutationen wurden die Kulturen stets frisch angesetzt.

Tabelle 4.12: Zusammensetzung *Buffered Charcoal Yeast Extract* (BCYE)-Agar

Menge	Substanz	Hersteller
5 g	ACES	GERBU
10 g	Yeast Extract (Bacto™) mit Milli-Q® auf 900 mL auffüllen mit 10 M KOH auf pH 6,9 einstellen mit Milli-Q® auf 1 L auffüllen	BD
2g	Aktivkohle	Fluka
15 g	Agar nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 50 °C zugeben:	Hellmuth Carroux GmbH & Co
0,4 g	Cystein in 10 mL Milli-Q® lösen und sterilfiltrieren	Sigma-Aldrich
10 mL	Fe(NO) ₃ x 9 H ₂ O (25 g/L) sterilfiltrieren Medium in Petrischalen gießen	Sigma-Aldrich

Tabelle 4.13: Zusammensetzung *Yeast Extract Broth* (YEB)-Flüssigmedium

Menge	Substanz	Hersteller
10 g	ACES	GERBU
10 g	Yeast Extract (Bacto™) mit Milli-Q® auf 900 mL auffüllen mit 10 M KOH auf pH 6,9 einstellen mit Milli-Q® auf 1 L auffüllen anschließend hinzugeben:	BD
0,4 g	Cystein in 10 mL Milli-Q® gelöst	Sigma-Aldrich
0,25 g	Fe ₄ (P ₂ O ₇) ₃ x 9 H ₂ O in 10 mL Milli-Q® unter Erwärmen gelöst Flüssigmedium mit Filtertop (0,2 µm Porengröße) sterilfiltrieren	Sigma-Aldrich TPP

4 Material und Methoden

Tabelle 4.14: Zusammensetzung chemisch definiertes Medium (CDM)

Menge	Substanz	Hersteller
300 mL	Milli-Q® vorlegen	GERBU
100 mL	10 x Aminosäure-Stocklösung	
100 mL	10 x ARQG-Stocklösung	
10 mL	100 x Tyrosin-Stocklösung	
100 mL	10 x Salze-Stocklösung	
10 g	ACES	
0,25 g	lösen und mit 10 M KOH auf pH 6,9 einstellen	TPP
	Fe ₄ (P ₂ O ₇) ₃ x 9 H ₂ O in 10 mL Milli-Q® lösen und hinzugeben	
	mit Milli-Q® auf 1 L auffüllen	
	Flüssigmedium mit Filtertop (0,2 µm Porengröße) sterilfiltrieren	

Die Stocklösungen für das CD-Medium sind in den Tabellen 4.15-4.18 beschrieben.

Tabelle 4.15: Zusammensetzung 10 x Aminosäure-Stocklösung

Substanz	Konzentration [g/L]
L-Arginin	3,5
L-Asparaginsäure	5,1
L-Cystein	4,0
L-Glutaminsäure	6,0
L-Histidin	1,5
L-Isoleucin	4,7
L-Leucin	6,4
L-Lysin	6,5
L-Methionin	2,0
L-Phenylalanin	3,5
L-Prolin	1,15
L-Serin	6,5
L-Threonin	3,3
L-Tryptophan	1,0
L-Valin	4,8

Tabelle 4.16: Zusammensetzung 10 x ANQG-Stocklösung

Substanz	Konzentration [g/L]
L-Alanin	5,0
L-Asparagin	1,5
L-Glutamin	2,5
L-Glycin	13,5

Tabelle 4.17: Zusammensetzung 10 x Salze-Stocklösung

Substanz	Konzentration [g/L]
NH ₄ Cl	3,15
NaCl	0,5
CaCl ₂	0,25
KH ₂ PO ₄	11,8
MgSO ₄	0,7

Tabelle 4.18: Zusammensetzung 100 x Tyrosin-Stocklösung

Substanz	Konzentration [g/L]
L-Tyrosin	40,0

Die verwendeten *E. coli*-Stämme wurden auf „*Lysogeny Broth*“ (LB)-Agar unter Standardbedingungen bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert (Tab. 4.19). Flüssigkulturen wurden in LB- oder „*Terrific Broth*“ (TB)-Flüssigmedium bei 37 °C und 200 rpm angezogen (Tab. 4.20). Bei Bedarf wurden die Medien mit 100 µg/mL Ampicillin versetzt.

Tabelle 4.19: Zusammensetzung „*Lysogeny Broth*“-Flüssigmedium (LB)

Menge	Substanz	Hersteller
5 g	Yeast Extract (Bacto™)	BD
10 g	Caseinpepton	Roth
5 g NaCl		Roth
(15 g)	(Agar)	Hellmuth Carroux
	Mit Milli-Q® auf 1 L auffüllen	GmbH & Co
	und autoklavieren	

Tabelle 4.20: Zusammensetzung „Terrific Broth“-Flüssigmedium (TB)

Menge	Substanz	Hersteller
11,8 g	Trypton	Roth
23,6 g	Yeast Extract (Bacto™)	BD
9,4 g	K ₂ HPO ₄	Roth
2,2 g	KH ₂ PO ₄	Roth
4 mL	Glycerin (100 %)	Roth
	Mit Milli-Q® auf 1 L auffüllen und autoklavieren	

4.4.2 Kryokonservierung von Bakterien

Die Kryokonservierung dient der Lagerung von Bakterien über einen längeren Zeitraum hinweg. Dazu wurde der zu konservierende Bakterienstamm auf einer Agarplatte des entsprechenden Mediums unter Standardbedingungen angezogen. Die angewachsene Kultur wurde dann mit 1 mL sterilem 1 x PBS von der Platte gespült und in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß gesammelt. Im Anschluss wurden 600 µL der Bakteriensuspension mit 600 µL sterilem 100 %-igen Glycerin vermischt und in ein Kryoröhrchen überführt. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Zur Wiederanzucht des konservierten Bakterienstammes wurde dieser mit Hilfe eines vorgekühlten *Cooling Racks* aus dem -80 °C-Gefrierschrank entnommen und mit einer sterilen Impföse auf einer Agarplatte des entsprechenden Mediums ausgestrichen. Die Tabelle 4.21 zeigt die Zusammensetzung von 10 x PBS.

Tabelle 4.21: Zusammensetzung 10 x PBS

Menge	Substanz
80 g	NaCl
2 g	KCl
12,5 g	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
2 g	KH ₂ PO ₄
	mit Milli-Q® auf 1 L auffüllen und autoklavieren

4.4.3 Bestimmung der Zelldichte

Für die Bestimmung der Zelldichte einer Bakterienkultur wurde die optische Dichte (OD) unter Verwendung eines Photometers ermittelt. Hierfür wurde bei *Legionellen* eine Wellenlänge von 600 nm eingesetzt, bei der Bestimmung der Zelldichte von *E. coli* -Stämmen 550 nm. Dabei wird das Licht der eingesetzten Wellenlänge durch die Bakteriensuspension hindurch geleitet und die Menge des nicht gestreuten Lichtes mit Hilfe eines Detektors ermittelt. Durch Zunahme der Zellzahl einer Bakterienkultur nimmt die Menge des nicht gestreuten Lichtes, welches den Detektor erreicht, ab und somit die optische Dichte zu.

4.4.4 Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli* -Zellen mit Rubidium-Chlorid

Für die Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen wurde zunächst eine Übernachtskultur der Stämme DH10 β , BL21 (DE3) oder Rosetta gami 2 (DE3) in LB-Flüssigmedium angesetzt. Am nächsten Tag wurden 2,5 mL der bewachsenen Kultur in einen 1 L Erlenmeyerkolben mit 250 mL LB-Flüssigmedium und 20 mM MgCl₂ überführt und unter Standardbedingungen bis zu einer OD₅₅₀ von 0,4-0,7 inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension 5 min bei 4000-6000 rpm und 4 °C zentrifugiert und das erhaltene Pellet vorsichtig mit 0,4 Volumen eiskaltem TFB-1-Puffer resuspendiert und für 5-10 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Bakterienpellet vorsichtig in 1/25 Volumen eiskaltem TFB2-Puffer gelöst und für weitere 15-60 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die kompetenten *E. coli*-Zellen in 100-200 μ L Aliquots in 1,5 mL Reagiergefäße abgefüllt und bei -80 °C gelagert. Die benötigten Puffer sind in den Tabellen 4.22 und 4.23 beschrieben.

Tabelle 4.22: Zusammensetzung TFB1-Puffer

Menge	Substanz
2,95 g	Kaliumacetat
1,47 g	CaCl ₂
9,9 g	MnCl ₂
12,1 g	RbCl
15 % (v/v)	Glycerin

4 Material und Methoden

	in Milli-Q® lösen und mit 1 M Essigsäure auf pH 5,8 einstellen mit Milli-Q® auf 1 L auffüllen und mit Filtertop (0,2 µm Porengröße) sterilfiltrieren Lagerung bei 4 °C
--	--

Tabelle 4.23: Zusammensetzung TFB2-Puffer

Menge	Substanz
2,1 g	MOPS oder PIPES
11,0 g	CaCl ₂
1,21 g	RbCl
15 % (v/v)	Glycerin
	in Milli-Q® lösen und mit 1 M KOH auf pH 6,5 einstellen mit Milli-Q® auf 500 mL auffüllen und mit Filtertop (0,2 µm Porengröße) sterilfiltrieren Lagerung bei 4 °C

4.4.5 Wachstumsversuche in YEB

Für die Durchführung von Wachstumsversuchen wurden zunächst Vorkulturen von *L. pneumophila* Corby WT, *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ und *L. pneumophila* Corby $\Delta pepN$ in YEB angesetzt und unter Standardbedingungen kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Hauptkulturen in 250 mL YEB in einem 500 mL Erlenmeyerkolben ohne Schikane auf eine OD₆₀₀ von 0,03 mit den Vorkulturen eingestellt. Anschließend wurde sofort die erste Messung bei OD₆₀₀ durchgeführt sowie von jeder Kultur 2 mL Bakteriensuspension steril entnommen, für 5 min bei 8000 rpm zentrifugiert und der Überstand bei -20 °C gelagert. Die weiteren Messungen sowie die Entnahme des Überstandes wurden an zufällig ausgewählten Zeitpunkten, möglichst in einem 2 h-Rhythmus, durchgeführt. Zur Erstellung einer Wachstumskurve wurde die gemessene OD₆₀₀ gegen die Zeit in einem Diagramm aufgetragen. Um die Mengen der sezernierten Proteine des Wildtyps mit den verschiedenen Deletionsmutanten zu vergleichen, wurden die Proteinkonzentrationen der Überstände mit Roti®-Nanoquant

bestimmt (siehe Kapitel 4.8.1). Für die Analyse der Proteaseaktivität wurde der Azocaseinassay verwendet (siehe Kapitel 4.8.2). Die gemessenen Proteinkonzentrationen und Proteaseaktivitäten wurden in einem Diagramm gegen die entsprechende OD₆₀₀ aufgetragen.

4.4.6 Wachstumsversuche in CDM

Die Durchführung der Wachstumsversuche in chemisch-definiertem Medium (CDM) wurden nach dem gleichen Prinzip durchgeführt wie die Wachstumsversuche in YEB (siehe 4.4.5). Hier wurden jedoch nur *L. pneumophila* Corby WT und *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ miteinander verglichen.

4.4.7 *Sliding Motility*

Für die Untersuchung der bakteriellen Oberflächentranslokation von *L. pneumophila* Corby und verschiedener Deletionsmutanten wurde der *Sliding Motility*-Assay nach Stewart et al. (2009) durchgeführt. Dafür wurden zunächst Vorkulturen von *L. pneumophila* Corby WT, *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$, *L. pneumophila* Corby $\Delta pepN$ und *L. pneumophila* Corby Δlpc_{0267} angesetzt und über Nacht unter Standardbedingungen bis zur späten Stationärphase (OD₆₀₀ > 3,2) kultiviert. Von den Bakterienkulturen wurden je 10 µL auf frisch hergestellte BCYE-Platten mit 0,5 % Agar-Anteil getropft und diese unter der Sterilwerkbank getrocknet. Im Anschluss erfolgte die Inkubation in einer feuchten Kammer bei 30 °C über 21 d. Nach 7 d, 14 d und 21 d wurde der Verlauf der *Sliding Motility* mit einer angelegten Messskala fotografisch dokumentiert und die Flächen von Kolonien und Tensidfilm mit Hilfe des Programms „Adobe Photoshop“ bestimmt.

4.4.8 Wachstum in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid

Die Katalase ist ein ubiquitäres Enzym, das Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff spalten kann. Es wird von vielen Pathogenen verwendet, um sich gegen das Immunsystem des Wirtes sowie gegen oxidativen Stress durchzusetzen (Iwase et al., 2013). Für Legionellen wurden bisher zwei Katalase-Peroxidasen beschrieben (Bandyopadhyay and Steinman, 1998). Um die Auswirkungen von Wasserstoffperoxid auf das Wachstum von *L. pneumophila* Corby und einer *proA*-negativen Deletionsmutante zu untersuchen, wurden zunächst Vorkulturen von *L. pneumophila* Corby WT und

4 Material und Methoden

L. pneumophila Corby Δ *proA* angesetzt und über Nacht unter Standardbedingungen kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Bakterien auf eine Zellzahl von 1×10^8 /mL mit 1 x PBS eingestellt und mit Hilfe einer 96-well round bottom-Platte bis zu einer Zellzahl von 1×10^3 /mL verdünnt. Je 10 μ L der entsprechenden Verdünnung wurden auf eckige BCYE-Agarplatten mit verschiedenen Wasserstoffperoxid-Konzentrationen (200 mM, 300 mM und 400 mM) in Doppelbestimmung aufgetropft und für 3-4 Tage bei 37 °C unter Standardbedingungen inkubiert. Die Auswertung erfolgte fotografisch und durch Auszählen der koloniebildenden Einheiten. Weiterhin wurde das Wachstum in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid in YEB-Flüssigmedium bestimmt. Dafür wurden Kulturen von *L. pneumophila* Corby WT und *L. pneumophila* Corby Δ *proA* in YEB-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,01 eingestellt. In 96-well flat bottom-Platten wurden die Bakterien in Anwesenheit von 0 mM, 0,039 mM, 0,078 mM, 0,156 mM, 0,313 mM, 0,625 mM, 1,25 mM, 2,5 mM, 5 mM und 10 mM H₂O₂ für 24 h bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Die OD₆₀₀ wurde jeweils bei 0 h und bei 24 h bestimmt.

4.4.9 Stationary Phase Survival

Um zu untersuchen, ob das veränderte Sekretom von *L. pneumophila* Corby Δ *proA* eine Rolle beim Überleben der Bakterien in der stationären Wachstumsphase spielt, wurde ein *Stationary Phase Survival-Assay* nach Bandyopadhyay and Steinman (2000) durchgeführt. Dafür wurden zunächst Vorkulturen von *L. pneumophila* Corby WT und *L. pneumophila* Corby Δ *proA* in 25 mL YEB in 100 mL Erlenmeyerkolben angesetzt und über Nacht unter Standardbedingungen kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Hauptkulturen vorbereitet. Dazu wurden 250 mL YEB in 500 mL Erlenmeyerkolben mit den Vorkulturen auf eine OD₆₀₀ von 0,03 angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. In Abständen von ca. 12 h wurde jeweils die OD₆₀₀ vermessen, 1 mL der Kultur entnommen und in seriellen Verdünnungen auf BCYE-Agarplatten ausplattiert, um die Kolonie-bildenden Einheiten der jeweiligen Zeitpunkte zu bestimmen.

4.4.10 Wachstum in Anwesenheit von Phytat

Um zu analysieren, ob das im Gegensatz zu *L. pneumophila* Corby WT veränderte Sekretom von *L. pneumophila* Corby Δ *proA* eine Auswirkung auf das Wachstum in Anwesenheit von Phytat hat, wurde ein Wachstumsversuch nach Weber et al. (2014) durchgeführt. Dazu wurden zunächst Vorkulturen von *L. pneumophila* Corby WT und

L. pneumophila Corby $\Delta proA$ in 25 mL YEB in 100 mL Erlenmeyerkolben angesetzt und über Nacht bei Standardbedingungen kultiviert. Am nächsten Tag wurde der Wachstumsversuch in 96-well flat bottom-Platte angesetzt. Dazu wurden pro well 200 μ L YEB-Medium mit 0 mM, 2 mM, 5 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 15 mM und 20 mM versetzt und mit den Vorkulturen auf eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt. Für jede Testbedingung wurden drei wells verwendet. Nicht verwendete Vertiefungen wurden mit je 200 μ L sterilem Milli-Q[®] gefüllt. Die Ansätze wurden bei 24 °C in einem Plattenschüttler bei 250 rpm über 5 Tage inkubiert. Die OD₆₀₀ wurde direkt nach dem Ansetzen des Wachstumsversuchs und am Ende der Inkubationszeit mit einem Plattenlesegerät vermessen.

4.4.11 Isolierung der Flagelle von *L. pneumophila*

Die Isolierung der Flagelle von *L. pneumophila* Corby wurde nach dem Protokoll von Montie et al. (1982), welches für die Präparation der Flagelle von *P. aeruginosa* entwickelt wurde, durchgeführt und leicht verändert. Dafür wurde zunächst eine Vorkultur von *L. pneumophila* Corby WT in 25 mL YEB in einem 100 mL Erlenmeyerkolben angesetzt und über Nacht unter Standardbedingungen schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag wurden je 300 μ L der Vorkultur auf mehrere BCYE-Agarplatten mit einem Drigalskispatel ausplattiert und in einer feuchten Kammer für 5 Tage bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien mit eiskaltem 10 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,0 von den Platten gespült und in 2 mL Reaktionsgefäßen für 15 min bei 5.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in Phosphat-Puffer resuspendiert (100 mL pro 6 g Feuchtgewicht der Zellen). Die Bakteriensuspension wurde in 13 mL Röhrchen überführt und mit Hilfe eines PT2500E von Polytron für 3 min homogenisiert. Im Anschluss erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 15 min bei 16.000 x g und 4 °C. Der erhaltene Überstand wurde für 3 h bei 40.000 x g und 4 °C ultrazentrifugiert und das Protein-Pellet in 200 μ L Phosphat-Puffer resuspendiert. Um den Erfolg der Isolierung zu überprüfen wurde die Proteinkonzentration mittels Roti[®]-Nanoquant (siehe Kapitel 4.8.1) vermessen und das Präparat via SDS-PAGE und Western-Blot analysiert (siehe Kapitel 4.8.4 und 4.8.8).

4.5 Zellbiologische Methoden

In den folgenden Unterkapiteln werden die in dieser Arbeit verwendeten zellbiologischen Methoden beschrieben.

4.5.1 Kultivierung von *Acanthamoeba castellanii*

Anzucht von *A. castellanii*

A. castellanii wurde in 75 cm² Zellkulturflaschen mit PYG-Medium bei 20 °C im Dunkeln angezogen (Tab. 4.24). Wenn die adhärennten Zellen zu 80-90 % konfluent gewachsen waren, konnten diese für Experimente eingesetzt oder gesplittet werden. Zum Lösen der Acanthamöben vom Boden der Zellkulturflasche wurde diese leicht auf eine Tischkante o.ä. aufgeklopft und die Zellen zusätzlich mit Hilfe einer serologischen Pipette abgespült. Zum Splitten wurde 1 mL der Amöbensuspension zu 24 mL PYG in eine neue Zellkulturflasche überführt und unter Standardbedingungen inkubiert.

Tabelle 4.24: Zusammensetzung PYG-Medium

Menge	Substanz	Hersteller
20 g	Proteose Pepton	BD
1 g	Yeast Extract (Bacto™)	BD
1 g	Na ₃ -Citrat	Riedel-de Haën
10 mL	MgSO ₄ (0,4 M Stocklösung)	Roth
10 mL	Na ₂ HPO ₄ (0,25 M Stocklösung)	Roth
10 mL	KH ₂ PO ₄ (0,25 M Stocklösung)	Roth
8 mL	CaCl ₂ (0,05 M Stocklösung) mit Milli-Q® auf 940 mL auffüllen und autoklavieren	Roth
18 g	Glukose in 50 mL Milli-Q® lösen und autoklavieren zur obigen Lösung geben	Roth
10 mL	(NH ₄)FeII(SO ₄) ₂ (0,005 M Stocklösung)	Fluka

Kryokonservierung von *A. castellanii*

Für die Kryokonservierung von *A. castellanii* wurden Zellen aus einer zu 80-90 % konfluent bewachsenen 75 cm² Zellkulturflasche verwendet. Diese wurden, wie in Kapitel 4.5.1 „Anzucht von *A. castellanii*“ beschrieben, vom Flaschenboden gelöst und in einem 50 mL Schraubgefäß bei 233 x g für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 mL PYG-Medium resuspendiert und die Zellzahl mit Kryokonservierungsmedium, nach Auszählen mit einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer, auf 1 x 10⁶ Zellen/mL eingestellt (Tab. 4.25). Die Acanthamoeben wurden sofort im Anschluss zu je 1 mL in Kryoröhrchen überführt und über Nacht in einem Nalgene Cryo 1C Freezing Container bei -80 °C gelagert. Durch das im Container enthaltene Isopropanol wurden die Kryostocks um 1 °C pro min schonend auf -80 °C heruntergekühlt und konnten anschließend bei -80 °C oder in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

Tabelle 4.25: Zusammensetzung Kryokonservierungsmedium für *A. castellanii*

Menge	Substanz
90 %	PYG-Medium
10 % (v/v)	DMSO
	sterilfiltrieren (mit 0,2 µm Filter)

Um kryokonservierte *A. castellanii* zu reanimieren, wurden die Zellen vorsichtig in einem 37 °C Wasserbad aufgetaut und anschließend sofort in ein Schraubgefäß mit 10 mL PYG-Medium überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt von 5 min bei 233 x g wurde das resultierende Pellet in 10 mL PYG-Medium resuspendiert und in eine 25 cm²-Zellkulturflasche überführt. Die Inkubation erfolgte nach den in Kapitel 4.5.1 beschriebenen Standardbedingungen.

4.5.2 Kultivierung von *Vermamoeba vermiformis*

Anzucht von *V. vermiformis*

Die Anzucht von *V. vermiformis* erfolgte in 25 mL PYNFH-Medium in 75 cm² Zellkulturflaschen bei 20 °C im Dunkeln (Tab. 4.26-4.27). Sobald die Zellen ca. 80-90 % konfluent gewachsen waren, wurden diese für Experimente verwendet oder gesplittet. Um *V. vermiformis* vom Boden der Zellkulturflasche zu lösen, wurde diese vorsichtig auf eine Tischkante aufgeklopft. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe einer sero-

4 Material und Methoden

logischen Pipette vom Flaschenboden gespült und 1 mL der Amöbenkultur zu 24 mL PYNFH-Medium gegeben.

Tabelle 4.26: Zusammensetzung Pufferlösung

Menge	Substanz	Hersteller
10 g	Na ₂ HPO ₄	Roth
7,24 g	KH ₂ PO ₄ mit Milli-Q® auf 400 mL auffüllen autoklavieren	Roth

Tabelle 4.27: Zusammensetzung PYNFH-Medium

Menge	Substanz	Hersteller
10 g	Bacto™ Pepton	BD
10 g	Yeast Extract (Bacto™)	BD
1 g	Ribonukleinsäure	Roth
15 mg	Folsäure	Roth
1 mg	Hemin (in 20 µL EtOH anlösen und mit Milli-Q® auf 1 mL auffüllen) in Milli-Q® lösen und pH 6,5 einstellen mit Milli-Q® auf 880 mL auffüllen und autoklavieren	Sigma
20 mL	<u>Nach dem Abkühlen hinzugeben:</u> Pufferlösung	
100 mL	hitzeinaktiviertes FCS	

Kryokonservierung von *V. vermiformis*

Für die Kryokonservierung von *V. vermiformis* wurden Zellen aus einer zu 80-90 % konfluent bewachsenen Kultur verwendet. Dazu wurden die Amöben durch vorsichtiges Klopfen vom Flaschenboden gelöst und in ein 50 mL Schraubgefäß überführt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 233 x g wurde das Zellpellet in 10 mL PYNFH-Medium resuspendiert. Im Anschluss wurde die Zellzahl mit Kryokonservierungsmedium, nach Auszählen mit einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer, auf 1 x 10⁶ Zellen/mL

eingestellt (Tab.4.28). Die Zellsuspension wurde anschließend sofort zu je 1 mL in Kryoröhrchen überführt und in einem Nalgene Cryo 1C Freezing Container über Nacht auf -80 °C heruntergekühlt. Am nächsten Tag konnten die kryokonservierten Amöben in flüssigen Stickstoff überführt oder weiter bei -80 °C gelagert werden.

Tabelle 4.28: Zusammensetzung Kryokonservierungsmedium für *V. vermiformis*

Menge	Substanz
90 %	PYNFH-Medium
10 % (v/v)	DMSO
	sterilfiltrieren (mit 0,2 µm Filter)

Für die Reanimierung der kryokonservierten *V. vermiformis* wurden die Amöben langsam in einem 37 °C Wasserbad aufgetaut und anschließend sofort in 10 mL PYNFH-Medium überführt. Die Zellen wurden für 5 min bei 233 x g zentrifugiert und das Pellet in 10 mL PYNFH-Medium resuspendiert. Im Anschluss wurden die Amöben einer 25 cm²-Zellkulturflasche unter den in Kapitel 4.5.2 beschriebenen Bedingungen kultiviert.

4.5.3 Kultivierung von THP-1-Makrophagen

Anzucht von THP-1-Zellen

Für die Anzucht der Makrophagen-ähnlichen Zelllinie THP-1 wurden die Zellen in 25 mL RPMI1640 mit 10 % FCS und 2 mM L-Glutamin in 75 cm² Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Sobald die Kultur zu 80-90 % bewachsen war, wurde diese für Experimente verwendet oder gesplittet. Für das Splitten wurden 2 mL der THP-1-Zellsuspension zu 23 mL vorgewärmtem RPMI-Medium gegeben und die Zellen unter Standardbedingungen angezogen.

Kryokonservierung von THP-1-Zellen

Um THP-1-Zellen über einen längeren Zeitraum hinweg haltbar zu machen, wurden diese kryokonserviert. Dazu wurde eine zu 80-90 % bewachsene Kultur einer 75 cm² Zellkulturflasche verwendet und die Zellen für 5 min bei 100 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 mL warmem RPMI 1640 mit 10 % FCS und 2 mM L-Glutamin resuspendiert und mit Kryokonservierungsmedium, nach Auszählen mit Hilfe einer

4 Material und Methoden

Fuchs-Rosenthal-Zählkammer, auf eine Zellzahl von 1×10^6 Zellen/mL eingestellt (Tab. 4.29). Sofort im Anschluss wurde je 1 mL der Zellsuspension in Kryoröhrchen pipettiert und diese über Nacht in einem Nalgene Cryo 1C Freezing Container gelagert. Durch das enthaltene Isopropanol wurden die Zellen schonend auf -80°C heruntergekühlt und konnten am nächsten Tag in einen mit flüssigem Stickstoff gefüllten Tank überführt werden.

Tabelle 4.29: Zusammensetzung Kryokonservierungsmedium für THP-1

Menge	Substanz
80 %	RPMI 1640 + 10 % FCS + 2 mM L-Glutamin
10 % (v/v)	zusätzliches hitzeinaktiviertes FCS
10 % (v/v)	DMSO
	sterilfiltrieren (mit $0,2\ \mu\text{m}$ Filter)

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten THP-1-Zellen wurden bei Bedarf wieder reanimiert. Dazu wurden die Kryoröhrchen nach Entnahme aus dem Stickstofftank in einem 37°C -warmen Wasserbad vorsichtig aufgetaut und anschließend umgehend in ein 50 mL Schraubgefäß mit 10 mL warmem RPMI-Medium überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt für 5 min bei $100 \times g$ wurden die Zellen in 20 mL warmem RPMI-Medium resuspendiert und in eine $75\ \text{cm}^2$ Zellkulturflasche überführt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5 % CO_2 .

Ausdifferenzieren von THP-1-Zellen

Um die THP-1-Zellen in einem Infektionsassay verwenden zu können, mussten diese zunächst ausdifferenziert werden. Dazu wurde eine zu 80-90 % bewachsene Kultur verwendet und die Zellsuspension bei $100 \times g$ für 5 min zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in warmem RPMI-Medium resuspendiert und durch Auszählen mit einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer auf eine Zellzahl von 5×10^5 Zellen/mL eingestellt. Um die THP-1 Monocyten in Makrophagen auszudifferenzieren, wurden 100 nM Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) pro Milliliter Zellsuspension hinzugegeben. Je 100 μL pro Well dieser Suspension wurden anschließend in eine 96-well flat bottom-Platte gegeben und für 48 h bei 37°C und 5 % CO_2 ausdifferenziert.

4.5.4 Kultivierung von HEK-Blue™ hTLR5-Zellen

Anzucht von HEK-Blue™ hTLR5

Die Zelllinie HEK-Blue™ hTLR5 (InvivoGen) ist entwickelt worden, um die Stimulation von humanem TLR5 durch die Aktivierung von NF- κ B zu untersuchen. Die Zellen wurden für die Anzucht in 25 mL DMEM mit 4,5 g/L Glukose, 2 mM L-Glutamin und 10 % FCS in Anwesenheit von 30 μ g/mL Blasticidin und 100 μ g/mL Zeocin™ in 75 cm²-Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Sobald die Kulturen zu 70-80 % konfluent bewachsen waren, wurde das Kulturmedium in der Zellkulturflasche durch 10 mL 1 x PBS ersetzt und die Zellen durch vorsichtiges Klopfen z.B. auf eine Tischkante und Abspülen vom Flaschenboden gelöst. Die HEK-Blue™ hTLR5-Zellen wurden anschließend für weitere Experimente verwendet oder gesplittet. Zum Splitten wurden 2 mL der Zellsuspension zu 23 mL warmem Kulturmedium gegeben und unter Standardbedingungen inkubiert.

Kryokonservierung von HEK-Blue™ hTLR5

Für die Kryokonservierung von HEK-Blue™ hTLR5 wurden Zellen einer zu 70-80 % konfluent bewachsenen Kultur in Anwesenheit von 10 mL 1 x PBS durch vorsichtiges Klopfen z.B. auf eine Tischkante und Abspülen vom Flaschenboden gelöst und für 5 min bei 100 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 mL 1 x PBS resuspendiert und mit Kryokonservierungsmedium, nach Auszählen mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer, auf eine Zellzahl von 5-7 x 10⁶ Zellen/mL eingestellt (Tab. 4.30). Anschließend wurden sofort je 1 mL der Zellsuspension in Kryoröhrchen überführt und in einem Nalgene Cryo 1C Freezing Container über Nacht bei -80 °C gelagert. Für die Langzeitlagerung wurden die HEK-Blue™ hTLR5 -Zellen am nächsten Tag in flüssigem Stickstoff überführt.

Tabelle 4.30: Kryokonservierungsmedium für HEK-Blue™ hTLR5

Menge	Substanz
80 %	DMEM + 4,5 g/ L Glukose + 2 mM L-Glutamin + 10 % FCS
10 % (v/v)	zusätzliches hitzeinaktiviertes FCS
10 % (v/v)	DMSO
	Sterilfiltrieren (mit 0,2 μ m Filter)

4 Material und Methoden

Bei Bedarf wurden die HEK-Blue™ hTLR5-Zellen wieder reanimiert. Dazu wurde das Kryoröhrchen vorsichtig in einem 37 °C-warmem Wasserbad aufgetaut und sofort im Anschluss zu 10 mL vorgewärmten Kulturmedium gegeben. Nach Zentrifugation bei 100 x g für 5 min wurde das Zellpellet in 10 mL Kulturmedium resuspendiert und in eine 25 cm²-Zellkulturflasche überführt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂. Die selektiven Antibiotika Blastidin und Zeocin™ sollten erst nach zweimaligem Passagieren hinzugegeben werden.

Untersuchung der TLR5-Stimulation mit HEK-Blue™ hTLR5-Zellen

Für die Untersuchung der Rolle der Zink-Metalloprotease ProA von *L. pneumophila* bei der TLR5-Aktivierung wurden Stimulationsassays mit HEK-Blue™ hTLR5-Zellen durchgeführt. Dabei aktiviert die Stimulation mit einem TLR5-Liganden NF- κ B und AP-1, welche die Produktion der *secreted embryonic alkaline phosphatase* (SEAP) induzieren. Mit Hilfe eines speziell für diesen Assay entwickelten Detektionsmedium (HEK-Blue™ Detection) kann die Produktion von SEAP sichtbar gemacht werden. Dafür wurden Zellen verwendet, die zu 50-80 % konfluent bewachsen waren. In eine 96-well flat bottom-Platte wurden je 20 μ L Probe, wie z.B. nativ gereinigtes FlaA und/oder ProA in unterschiedlichen Konzentrationen gegeben. Als Positivkontrolle wurde 100 ng/mL nativ gereinigtes FliC von *P. aeruginosa* sowie 1 x PBS als Negativkontrolle mitgeführt. Die HEK-Blue™ hTLR5-Zellen wurden einmal mit 5 mL vorgewärmtem 1 x PBS gewaschen und anschließend mit 10 mL 1 x PBS durch vorsichtiges Klopfen und Abspülen mit einer serologischen Pipette vom Flaschenboden gelöst und in ein 50 mL Schraubgefäß überführt. Durch Auszählen mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer wurde die Zellzahl auf $1,4 \times 10^5$ Zellen/mL in HEK-Blue™ Detection-Medium eingestellt und je 180 μ L zu den Proben in der 96-well flat bottom-Platte gegeben. Die Inkubation erfolgte für 16 h bei 37 °C und 5 % CO₂. Die Produktion von SEAP wurde durch einen Farbumschlag des Mediums nach violett/-blau und Messung der OD bei 620 nm bestimmt.

4.6 Infektionsbiologische Methoden

In den folgenden Unterkapiteln werden die in dieser Arbeit verwendeten infektionsbiologischen Methoden erläutert.

4.6.1 Infektionsversuche mit *A. castellanii* und *V. vermiformis*

Um die Vermehrung von *L. pneumophila* Corby und verschiedener Deletionsmutanten in *A. castellanii* und *V. vermiformis* zu analysieren, wurden zunächst Zellen einer zu 80-90 % konfluent bewachsenen Kultur durch Klopfen auf z.B. einer Tischkante vom Flaschenboden gelöst. Anschließend wurden die Amöben für 5 min bei $233 \times g$ zentrifugiert und die Zellzahl durch Auszählen mit einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer in Amöbenpuffer (*A. castellanii*), bzw. Assay-Medium (*V. vermiformis*) auf 5×10^5 Zellen/mL eingestellt (Tab. 4.31-4.33). In 25 cm²-Zellkulturflaschen wurden je 5 mL der Zellsuspension überführt und für 30-60 min bei 20 °C inkubiert, bis die Zellen adhären waren. Für die Infektion wurde *L. pneumophila* Corby WT, *L. pneumophila* Corby $\Delta dotA$, *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$, *L. pneumophila* Corby $\Delta pepN$ und *L. pneumophila* Corby Δlpc_{0267} nach 3-4-tägiger Inkubation mit 1 x PBS von BCYE-Agarplatten gespült und auf 1×10^6 Zellen/mL in Amöbenpuffer bzw. Assay-Medium eingestellt. Für eine MOI (*multiplicity of infection*) von 0,02 wurden jeweils 50 µL der eingestellten Legionellen zu den adhären Amöben gegeben. Bei der Verwendung der geringen MOI wurde davon ausgegangen, dass jedes Bakterium von einer Wirtszelle aufgenommen wurde und somit auf den Einsatz von Antibiotika bei den Versuchen verzichtet. Nach 2 h, 24 h, 48 h und 72 h wurden die Zellen vorsichtig vom Flaschenboden abgeklopft und je 200 µL der Zell- und Bakteriensuspension entnommen. Nach Zentrifugation bei $20.000 \times g$ für 5 min erfolgte das Vortexen der Proben für ca. 30 s. Jeweils 20 µL der Proben wurden in verschiedenen Verdünnungsstufen in 1 x PBS auf BCYE-Agarplatten aufgetragen und diese für 3-4 Tage bei 37 °C inkubiert.

Tabelle 4.31: Zusammensetzung Amöbenpuffer für *A. castellanii*

Menge	Substanz	Hersteller
1 g	Na ₃ -Citrat	Riedel-de Haën
10 mL	MgSO ₄ (0,4 M Stocklösung)	Roth
10 mL	Na ₂ HPO ₄ (0,25 M Stocklösung)	Roth
10 mL	KH ₂ PO ₄ (0,25 M Stocklösung)	Roth
	mit Milli-Q® auf 990 mL auffüllen und autoklavieren	
10 mL	(NH ₄)FeII(SO ₄) ₂ (0,005 M Stocklösung)	Fluka

4 Material und Methoden

Tabelle 4.32: Zusammensetzung Assay-Medium für *V. vermiformis*

Menge	Substanz
50 %	PYNFH-Medium ohne FCS
50 %	Puck's Saline F

Tabelle 4.33: Zusammensetzung Puck's Saline F für *V. vermiformis*

Menge	Substanz	Hersteller
0,016 g	CaCl ₂	Roth
0,285 g	KCl	Roth
0,083 g	KH ₂ PO ₄	Roth
0,154 g	MgSO ₄ mit Milli-Q® auf 100 mL auffüllen und autoklavieren	Roth
1,1 g	Glukose in 10 mL Milli-Q® lösen autoklavieren zur obigen Lösung hinzugeben	Roth

Infektionsversuche mit *A. castellanii* in Anwesenheit von Phytat

Um zu analysieren, welche Auswirkungen das veränderte Sekretom von *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ auf die Infektion von Phytat-beladenen *A. castellanii*-Zellen hat, wurden die Amöben, wie von Weber et al. (2014) beschrieben, zunächst mit sich schrittweise erhöhender Phytat-Konzentration kultiviert. Zunächst wurden die Zellen dazu mit einer Anfangskonzentration von 2,5 mM Phytat in PYG-Medium gesplittet. Bei jedem Splitten wurde die Phytat-Konzentration erhöht, bis sie am Ende bei 10 mM lag. Die Infektion der Phytat-beladenen Amöben wurde, wie in Kapitel 4.6.1 beschrieben, durchgeführt.

4.6.2 Infektionsversuche mit THP-1-Zellen

Für die Untersuchung der Vermehrung von *L. pneumophila* Corby und verschiedenen Deletionsmutanten in der humanen Makrophagen-ähnlichen Zelllinie THP-1 wurden

diese zunächst, wie in Kapitel 4.5.3 beschrieben, ausgesät und für 48 h in einer 96-*well flat bottom*-Platte inkubiert. Für die Infektion wurden Vorkulturen von *L. pneumophila* Corby WT, *L. pneumophila* Corby Δ dotA, *L. pneumophila* Corby Δ proA, *L. pneumophila* Corby Δ pepN und *L. pneumophila* Corby Δ lpc_0267 in 25 mL YEB-Flüssigmedium angesetzt und über Nacht unter Standardbedingungen kultiviert. Am nächsten Tag wurden die stationären Legionellenkulturen mit RPMI-Medium auf eine Zellzahl von 1×10^6 /mL eingestellt. Die ausdifferenzierten THP-1-Zellen wurden zweimal mit vorgewärmtem RPMI-Medium gewaschen und 100 μ L Legionellensuspension pro *well* hinzugegeben, um eine MOI von 1 zu erzielen. Nach Inkubation von 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die infizierten Zellen dreimal mit je 200 μ L warmem RPMI-Medium gewaschen. Zur Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (*colony forming units*, cfu) pro mL wurde nach 2 h, 24 h und 48 h je 20 μ L steriles 1 % Triton X-100 pro Ansatz hinzugegeben, um die THP-1-Zellen zu lysieren. Im Anschluss wurden jeweils 20 μ L jeder Probe in serieller Verdünnung in 1 x PBS auf BCYE-Agarplatten aufgetragen und für 3-4 Tage bei 37 °C inkubiert.

4.6.3 Infektionsversuche mit humanen Lungengewebsexplantaten

Infektionen von humanem Lungengewebsexplantaten (HLEs) bieten im Vergleich zu Zellkultur-Modellen die Möglichkeit, Interaktionen zwischen verschiedenen Zelltypen und extrazellulären Komponenten zu beobachten. Weiterhin ist hier die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf eine Infektion im Menschen deutlich mehr gegeben als z.B. in einem Tiermodell (Jäger et al., 2014). Für die Infektion von HLEs wurde tumorfrees Gewebe von Lungenkrebspatienten eingesetzt, das nur wenige Stunden zuvor bei einem chirurgischen Eingriff entnommen wurde. Die Explantate wurden mit einem sterilen Skalpell in Stücke von ca. 100 mg Gewicht geschnitten und sofort in Lungenmedium überführt (Tab. 4.34). Anschließend wurden Legionellen aus stationären Flüssigkulturen auf eine Zellzahl von 1×10^7 Bakterien/mL in Lungenmedium eingestellt und Zusätze wie gereinigtes Protein nach Bedarf hinzugegeben. Je 2 mL der Bakteriensuspension pro *well* wurden in eine 24-*well flat bottom*-Platte überführt und die vorbereiteten Lungenstücke mit einer sterilen Pinzette dazugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂. Nach 2 h, 24 h und 48 h wurden Lungenstücke in Doppelbestimmung entnommen und in mit sterilem dH₂O befüllte 13 mL-Röhrchen

4 Material und Methoden

überführt. Nach Bestimmung des Gewichtes der einzelnen Lungenstücke wurden diese homogenisiert und in serieller Verdünnung in 1 x PBS auf BCYE-Agarplatten ausplattiert. Nach 3-4 Tagen Inkubation bei 37 °C konnte durch Auszählen der Kolonien die *cfu*/mL bestimmt werden. Für die Analyse von proinflammatorischen Reaktionen während der Infektion, wie z.B. der hTLR5-aktivierenden Eigenschaften (vergl. Kapitel 4.5.4) oder der Produktion des Chemokins Interleukin-8 (IL-8, vergleiche Kapitel 4.8.15), wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Kulturüberstände entnommen und in 2 mL Reaktionsgefäßen bis zur Analyse bei -80 °C eingefroren.

Tabelle 4.34: Zusammensetzung Nährmedium für HLTEs

Menge	Substanz	Hersteller
500 mL	RPMI 1640 + 2 mM L-Glutamin	GE Healthcare
10 %	FCS	Biochrom
20 mM	HEPES	Sigma
1 mM	Na-Pyruvat	Sigma

Zusätzlich zur Bestimmung der koloniebildenden Einheiten wurden histologische Untersuchungen des Lungengewebes durchgeführt. Dazu wurden Lungenstücke nach 2 h, 24 h und 48 h steril entnommen und über Nacht in je 10 mL HOPE-Lösung fixiert. Am nächsten Tag wurden die Gewebeproben über 6 h in je 3 mL Aceton bei 4 °C entwässert, wobei dieses alle 90 min erneuert wurde. Im Anschluss wurden die Lungenstücke in Einbettkassetten überführt und über Nacht bei 54 °C in flüssigem Paraffin gelagert. Nachfolgend wurden die Proben in Paraffinblöcke eingebettet und für weitere Analysen bei 4 °C aufbewahrt. Für die mikroskopischen Untersuchungen wurden mit Hilfe eines Mikrotoms Schnitte angefertigt, die mit Hämatoxylin-Eosin- oder Immunfärbung behandelt wurden. Die Infektionen der HLTEs für die histologischen Untersuchungen wurden von Jana Tiefenau vom Institut für Mikrobiologie der TU Braunschweig durchgeführt. Die Präparation und Auswertung der histologischen Schnitte erfolgte durch Dr. Sebastian Marwitz am Institut für klinische und experimentelle Pathologie im Forschungszentrum Borstel.

4.7 Molekularbiologische Methoden

In den folgenden Unterkapiteln werden die in dieser Arbeit angewandten molekularbiologischen Methoden beschrieben.

4.7.1 Isolation genomischer DNA

Für die Isolierung der genomischen DNA von *L. pneumophila* wurde die Phenol-Chloroform-Fällung angewandt. Es wurden 2 mL einer Übernachtskultur von *L. pneumophila* Corby in einem 2 mL Reaktionsgefäß für 3 min bei 16.000 x g zentrifugiert und das Pellet in 1 mL TNE-Puffer resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde der Überstand verworfen und das erhaltene Bakterienpellet in 600 µL Lysepuffer aufgenommen. Der Aufschluss der Zellen erfolgte für 30 min bei 37 °C. Anschließend wurden der Suspension 30 µL Proteinase K hinzugefügt und 2 h bei 65 °C inkubiert. Zu dem nun klaren Ansatz wurden 500 µL Phenol/Chloroform (1:1) gegeben, für 10 s gut gemischt und anschließend 5 min bei 8000 x g zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde vorsichtig entnommen und mit 500 µL Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1) versetzt. Der Ansatz wurde für 45 min bei RT und 1000 rpm schüttelnd inkubiert und anschließend 10 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Danach wurde die obere, wässrige Phase in ein neues 2 mL Reaktionsgefäß überführt und 0,5 Volumen 5 M NaCl sowie 2,5 Volumen Ethanol (abs.) hinzugegeben und vorsichtig vermischt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 16.000 x g wurde der Überstand verworfen und das erhaltene Pellet zweimal mit 70 %-igem Ethanol und einmal mit Ethanol (abs.) gewaschen. Anschließend wurde das Pellet für mindestens 20 min bei RT getrocknet und danach in 200 µL sterilem Milli-Q® aufgenommen. Die Konzentration und Reinheit wurde mit Hilfe eines Mikrovolumen UV/VIS-Spektrophotometers bestimmt (Kap. 4.7.2). Die Tabelle 4.35 zeigt die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen.

Tabelle 4.35: Lösungen für die DNA-Isolierung

Puffer	Menge	Substanz
TNE-Puffer	10 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	10 mM	NaCl
	10 mM	EDTA
TNEX-Puffer	99 % (v/v)	TNE-Puffer
	1 % (v/v)	Triton X-100

Lysepuffer	585 μL 15 μL	TNEX-Puffer Lysozym (20 mg/ mL Stocklösung)
------------	---------------------------------------	---

4.7.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung gereinigter Nukleinsäuren erfolgte mit Hilfe eines Mikrovolumen UV/VIS-Spektrophotometers durch Messung der Extinktion bei 260 nm. Diese Methode bietet die Möglichkeit, Konzentrationsbestimmungen mit einem geringen Probenvolumen (1 μL) durchzuführen. Dabei entspricht eine OD_{260} von 1 einer dsDNA-Konzentration von 50 $\mu\text{g/mL}$. Zur Bestimmung der Reinheit der Nukleinsäure-Probe wurde die Extinktion bei 260 nm und 280 nm gemessen und der Quotient aus beiden Werten gebildet. Ein Verhältnis von 1,8-2,0 entspricht einer reinen DNA-Lösung. Alle Werte unter 1,6 sprechen für eine starke Kontamination durch Proteine oder Phenol.

4.7.3 Agarosegelelektrophorese

Um die Größe von DNA-Fragmenten bestimmen zu können, wurde das Verfahren der Agarosegelelektrophorese eingesetzt. Dazu wurde ein 1 %-iges Agarosegel hergestellt und die verwendete DNA im Verhältnis 1:5 (v/v) mit 6 x DNA-Ladepuffer versetzt und in die Taschen des Agarosegel gegeben (Tab. 4.36-4.38). Durch Anlegen eines elektrischen Feldes bei 75 V und 120 mA wandert die negativ geladene DNA zur positiv geladenen Anode und wird durch ihre Größe und Konformation in der polymerisierten Agarose aufgetrennt. Dabei werden kleinere DNA-Moleküle schneller durch das Gel gezogen als größere. Der Farbstoff Bromphenolblau im DNA-Ladepuffer diene als Indikator, um den Fortschritt der Elektrophorese abschätzen zu können. Um die DNA-Fragmente sichtbar zu machen, wurde das Agarosegel nach der Elektrophorese mit dem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid für 15 min gefärbt und nach einem kurzen Waschschrift in Milli-Q[®] unter UV-Licht betrachtet und fotografisch dokumentiert (Tab. 4.39). Die Größe und auch die Konzentration der aufgetragenen Nukleinsäuren wurden durch Vergleich mit einem Größenstandard (Abb. 4.1) bestimmt.

Tabelle 4.36: Zusammensetzung 1 % Agarosegel

Menge	Substanz	Hersteller
2 g	Agarose NEEO Ultra-Qualität	Roth
200 mL	1 x TAE	
	Agarose durch Aufkochen lösen Gel nach abkühlen auf ca. 50 °C gießen	

Tabelle 4.37: Zusammensetzung 50 x TAE-Lösung

Menge	Substanz
242 g	Tris
57,1 mL	Essigsäure
100 mL	0,5 M EDTA pH 8,0 mit Milli-Q® auf 1 L auffüllen

Tabelle 4.38: Zusammensetzung 6 x DNA-Ladepuffer

Menge	Substanz
350 µM	Bromphenolblau
450 µM	Xylencyanol FF
50 % (v/v)	Glycerin

Tabelle 4.39: Zusammensetzung Ethidiumbromid-Färbelösung

Menge	Substanz	Hersteller
2 µg/mL (3 Tropfen)	1 % Ethidiumbromid-Lösung in Wasser (10 mg/mL) zu 600 mL Milli-Q® geben	Roth

4.7.4 Herstellung von *L. pneumophila* Deletionskonstrukten

Um Deletionsmutanten von *L. pneumophila* zu erzeugen, wurde der Vorgang der homologen Rekombination genutzt. Dazu wurden zunächst entsprechende Deletionskonstrukte mittels Polymerase-Kettenreaktion (engl.: *polymerase chain reaction*, PCR)

4 Material und Methoden

hergestellt. In jedem Fall wurden dafür zunächst geeignete Oligonukleotide (Primer) konstruiert und diese von der Firma Eurofins bezogen. Wichtig war zudem, dass die Deletionsregionen von 1-1,5 kb großen, dem GOI (*gene of interest*) benachbarten Sequenzen flankiert wurden, um die homologe Rekombination zu erleichtern. Um ein solches Konstrukt herzustellen, wurden unterschiedliche Verfahren angewandt, die in den folgenden Unterkapiteln genauer beschrieben sind.

Herstellung von Deletionskonstrukten mittels Joining-PCR

Für dieses Verfahren zur Herstellung eines Deletionskonstrukts wurden zunächst Primer entworfen, um die *upstream* und *downstream* gelegenen, das GOI flankierenden Regionen amplifizieren zu können. Die Primer UFF (*upstream flanking forward*) und DFR (*downstream flanking reverse*) lagen dabei an den Enden des Deletionskonstrukts und wurden so gewählt, dass sie nicht innerhalb eines anderen Gens banden. An den zum GOI gelegenen Enden der flankierenden Regionen banden die Primer UFR (*upstream flanking reverse*) und DFF (*downstream flanking forward*). Diese wiesen 3'-Überhänge auf, welche komplementär zu den 5'-Enden des Kanamycin-Resistenzgens *nptI* waren. In mehreren PCRs wurden die GOI-flankierenden Regionen amplifiziert, wobei genomische DNA von *L. pneumophila* Corby als Template diente. Das Kanamycin-Resistenzgen *nptI* wurde, ausgehend von einem Mini-Tn10 Transposon, mit dem Primerpaar NptI_Fa und NptI_R vervielfältigt, sodass 5'-Überhänge komplementär zu den flankierenden Regionen entstanden. Die erhaltenen Fragmente wurden mit Hilfe des Qiagen PCR Purification Kits nach Herstellerangaben aufgereinigt und durch eine sogenannte Joining-PCR zum Deletionskonstrukt zusammengefügt (Abb. 4.3). Dazu wurden das *upstream*-Fragment, das *nptI*-Gen und das *downstream*-Fragment im Verhältnis 1:3:1 eingesetzt und die jeweils an den Enden des Konstrukts liegenden Primer UFF und DFR verwendet. Das erhaltene PCR-Produkt wurde in einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt und die entsprechende Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Aufreinigung aus dem Gel erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach den Herstellerangaben. Um das *blunt end*-Produkt mit einem Vektor fusionieren zu können, wurde eine AT-Klonierung durchgeführt. Dabei wurden mit Hilfe der Taq-Polymerase, durch Inkubation für 20 min bei 70 °C in Anwesenheit von dATP, Adeninüberhänge an das Joining-Produkt angehängt. In einem nachfolgenden Ligationsschritt wurde so das adenylierte Deletionskonstrukt mit den Thyminüberhängen des Vektor pGEM®-T Easy verbunden.

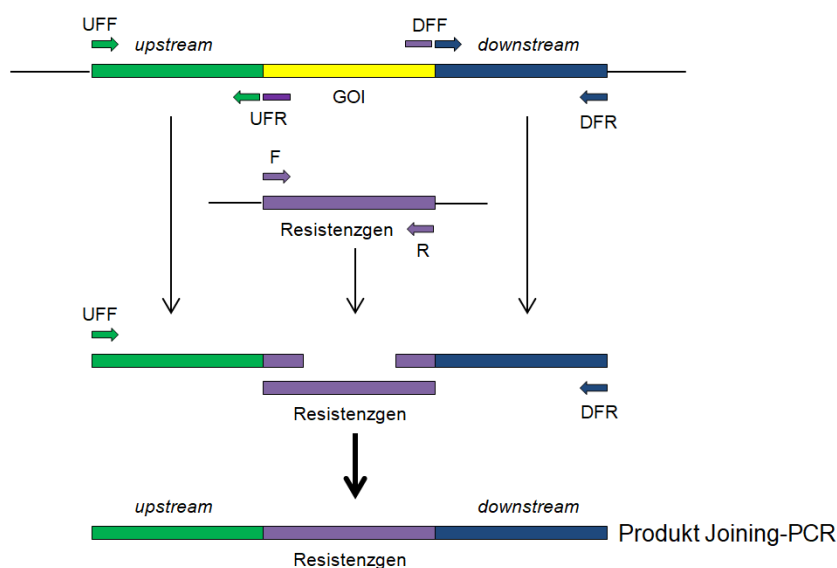


Abbildung 4.3: Schema zur Herstellung eines Deletionskonstrukts mittels Joining-PCR. In drei verschiedenen PCRs wurden zunächst die *upstream* und *downstream* gelegenen flankierenden Regionen und die Resistenzkassette amplifiziert. Die Primer UFR und DFF verfügten dabei über 3'-Überhänge, die komplementär zu den 5'-Enden des entsprechenden Resistenzgens waren. Anschließend wurden die erhaltenen Fragmente in einer Joining-PCR mit den Primern UFF und DFR zum Deletionskonstrukt zusammengefügt.

Die Ligation erfolgte über Nacht bei 17 °C. Im Anschluss wurde der gesamte Ansatz für die Transformation von RbCl-kompetenten *E. coli* DH10ß (siehe Kap. 4.7.5) verwendet. Mit diesem Verfahren wurden die Deletionskonstrukte für die *dotA*-, *proA*- und *LpC_0267*-negativen Mutanten hergestellt. Die Tabellen 4.40-4.43 zeigen die verschiedenen PCR-Ansätze und -Programme sowie die Zusammensetzung der Ligation.

Tabelle 4.40: Zusammensetzung PCR-Ansatz mit Q5®-Polymerase

Menge	Substanz
10 µL	5 x Q5® Reaction Buffer
1 µL	10 mM dNTPs
2,5 µL	10 µM <i>forward</i> Primer
2,5 µL	10 µM <i>reverse</i> Primer
1 µL	DNA
0,5 µL	Q5® High-Fidelity DNA Polymerase
32,5 µL	Nuklease-freies Wasser
Σ 50,0 µL	

4 Material und Methoden

Tabelle 4.41: PCR-Programm Q5®-Polymerase

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	98 °C	30 s
35 Zyklen: Denaturierung	98 °C	10 s
Annealing	63 °C	10 s
Elongation	72 °C	20-30 s/kb
Finale Elongation	72 °C	2 min
Pause	8 °C	∞

Tabelle 4.42: Zusammensetzung Ansatz A-Addition

Menge	Substanz
5 µL	2 mM dATP
0,2 µL	<i>Taq</i> DNA-Polymerase
5 µL	10 x ThermoPol® Buffer
40 µL	aufgereinigtes PCR-Produkt
Σ 50,2 µL	

Tabelle 4.43: Zusammensetzung Ligationsansatz

Menge	Substanz
2 µL	10 x T4 DNA Ligase Buffer
1 µL (50 ng)	pGEM®-T Easy Vektor
x µL	Insert DNA (im Verhältnis 1:3 zum Vektor)
1 µL	T4 DNA Ligase
	mit Nuklease-freiem Wasser auf 20 µL auffüllen

Herstellung von Deletionskonstrukten durch Einfügen von Restriktionsschnittstellen

Da die Herstellung eines Deletionskonstrukts mittels Joining-PCR nicht für alle geplanten Konstrukte erfolgreich war, wurden diese teilweise auch durch das Einfügen von Restriktionsschnittstellen erzeugt (Abb. 4.4). Dafür wurde zunächst das komplette GOI, zusammen mit den *upstream* und *downstream* gelegenen flankierenden Re-

gionen, mit Hilfe der UFF- und DFR- Primer amplifiziert. Nach Aufreinigung des PCR-Produktes mit dem Qiagen PCR Purification Kit wurde, wie bereits in Kapitel 4.7.4 beschrieben, eine AT-Klonierung durchgeführt und das Konstrukt mit dem Vektor pGEM®-T Easy ligiert. Im Anschluss wurden chemisch-kompetente *E. coli* DH10 β -Zellen transformiert (siehe Abschnitt 4.7.5). Erhaltene weiße Kolonien wurden mit Hilfe einer Kolonie-PCR auf das Vorhandensein des inserierten Konstrukts überprüft. Dafür wurde mit einer Pipettenspitze ein wenig Zellmaterial einer Kolonie entnommen und in 100 μ L Nuklease-freiem Wasser für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Nach Zentrifugation für 15 s bei maximaler Geschwindigkeit wurden je 5 μ L des Überstandes, der die freigewordene DNA enthielt, als Template für die Kolonie-PCR eingesetzt (Tab. 4.44-4.45).

Tabelle 4.44: Zusammensetzung PCR-Ansatz mit *Taq*-Polymerase

Menge	Substanz
2,5 μ L	10 x ThermoPol® Buffer
0,5 μ L	10 mM dNTPs
0,5 μ L	10 μ M <i>forward</i> Primer
0,5 μ L	10 μ M <i>reverse</i> Primer
5 μ L	Template DNA
0,125 μ L	<i>Taq</i> DNA Polymerase
15,875 μ L	Nuklease-freies Wasser
Σ 25 μ L	

Tabelle 4.45: PCR-Programm *Taq*-Polymerase

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	30 s
30 Zyklen: Denaturierung	95 °C	15 s
Annealing	57 °C	30 s
Elongation	68 °C	1 min/ kb
Finale Elongation	68 °C	5 min
Pause	8 °C	∞

Stellte sich der Klon als positiv heraus, wurde mit einer Pipettenspitze ein wenig Zellmaterial der Kolonie entnommen, diese zu 5 mL LB-Medium mit 100 μ g/mL Ampi-

4 Material und Methoden

cillin gegeben und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterien für 5 min bei 8000 x g zentrifugiert und aus dem Bakterienpellet unter Verwendung des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen) die Plasmid-DNA nach Herstellerangaben isoliert.

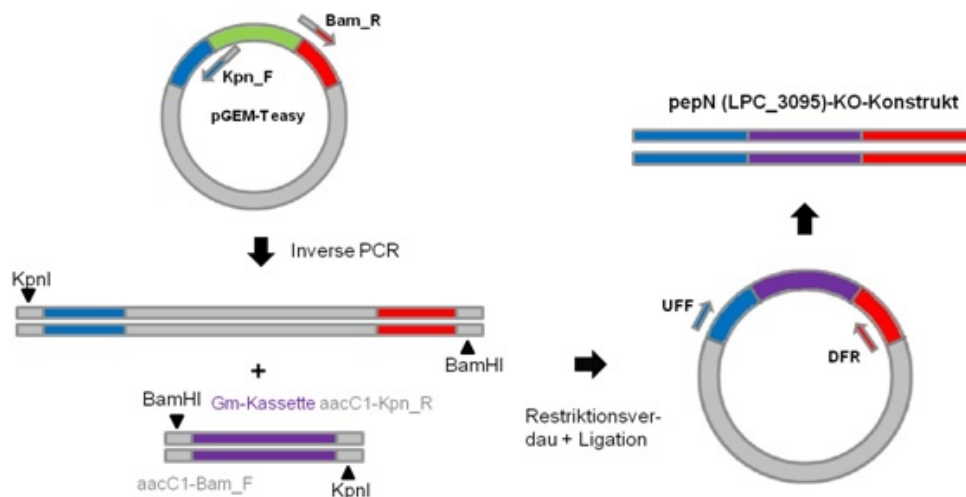


Abbildung 4.4: Schema zur Herstellung eines Deletionskonstrukts durch Einfügen von Restriktionsschnittstellen. Mit einer inversen PCR unter Verwendung von Primern, die jeweils eine Restriktionsschnittstelle im Überhang trugen (*forward* Primer: *Kpn*I-Schnittstelle, *reverse* Primer: *Bam*HI-Schnittstelle), wurde das gesamte Plasmid, bis auf das GOI, amplifiziert. Die Resistenzkassette wurde ebenfalls mit den entsprechenden Schnittstellen versehen. Nach einem Restriktionsverdau von Plasmid und Resistenzkassette konnten diese in einem Ligationsansatz miteinander verbunden und das GOI durch das Resistenzgen ersetzt werden. Nach einer weiteren PCR mit den Primern *UFF* und *DFR* wurde das fertige Deletionskonstrukt erhalten, welches anschließend für den Knockout durch homologe Rekombination in *L. pneumophila* verwendet wurde (Schürer, 2015)

Ausgehend von dem Plasmid mit der inserierten Deletionsregion wurde eine inverse PCR durchgeführt. Dabei wurde mit Hilfe von Primern, die jeweils eine Restriktionsschnittstelle (*forward* Primer: *Bam*HI, *reverse* Primer: *Kpn*I) im Überhang trugen, das gesamte Plasmid, bis auf das GOI, amplifiziert. Dadurch wurde ein PCR-Produkt erzeugt, das den linearen pGEM®-T Easy Vektor mit den beiden *upstream* und *downstream* flankierenden Regionen sowie Restriktionsschnittstellen an beiden Enden enthielt. Das Gentamicin-Resistenzgen *aacC1* wurde, ausgehend vom Vektor pUCP22, ebenfalls mit Restriktionsschnittstellen (*forward* Primer: *Bam*HI-Schnittstelle, *reverse* Primer: *Kpn*I-Schnittstelle) mittels PCR vervielfältigt. Nach Aufreinigung der PCR-Produkte mit dem Qiagen PCR Purification Kit nach Herstellerangaben wurde ein Restriktionsverdau mit den Enzymen *Kpn*I und *Bam*HI für 1 h bei 37 °C durchgeführt (Tab. 4.46-4.47).

Tabelle 4.46: Restriktionsverdau pGEM®-T Easy mit flankierenden Regionen

Menge	Substanz
10 µL	Linearisierter Vektor mit flankierenden Regionen
5 µL	Cut Smart Buffer
1,5 µL	<i>Bam</i> HI-HF
1,5 µL	<i>Kpn</i> I-HF
2 µL	Antarktische Phosphatase (NEB)
30 µL	Nuklease-freies Wasser
∑ 50 µL	

Tabelle 4.47: Zusammensetzung Restriktionsverdau Gentamicin-Kassette

Menge	Substanz
20µL	Resistenzkassette
3 µL	Cut Smart Buffer
1,5 µL	<i>Bam</i> HI-HF
1,5 µL	<i>Kpn</i> I-HF
24 µL	Nuklease-freies Wasser
∑ 50 µL	

Im Anschluss wurden die Restriktionsansätze mit dem Qiagen PCR Purification Kit aufgereinigt und über Nacht bei 17 °C ligiert (Tab. 4.48).

Tabelle 4.48: Ligationsansatz pGEM®-T Easy mit Gentamicin-Kassette

Menge	Substanz
2 µL	10 x T4 DNA Ligase Buffer
1,25 µL	Gentamicin-Kassette (im Verhältnis 1:3 zum Vektor)
6,75 µL (50 ng)	Vektor mit flankierenden Regionen
1 µL	T4 DNA Ligase
9 µL	Nuklease-freies Wasser
∑ 20 µL	

Der komplette Ligationsansatz wurde am nächsten Tag in chemisch-kompetente *E. coli* DH10ß-Zellen eingebracht (siehe Kapitel 4.7.5). Mit diesem Verfahren wurde das

Deletionskonstrukt zur Herstellung der *pepN*-negativen Mutante erzeugt.

4.7.5 Transformation von chemisch-kompetenten *E. coli*

Um DNA in chemisch-kompetente *E. coli*-Zellen einzubringen, wurde die sogenannte Hitzeschock-Methode angewandt. Für die Transformation von Deletions- und Insertionskonstrukten wurden 20 µL des entsprechenden Vektors mit 50 µL kompetenter *E. coli* DH10ß-Zellen vermischt und für 20 min auf Eis gelagert. Anschließend wurde der Ansatz für 45 s auf 42 °C erhitzt und danach sofort für 2 min auf Eis gegeben. Danach wurden 250 µL LB-Flüssigmedium hinzugefügt und der Transformationsansatz für 1 h bei 37 °C und 300 rpm inkubiert. Je 2 µL, 20 µL und 200 µL der transformierten Zellen wurden auf LB-Agarplatten mit 100 µg/mL Ampicillin, 500 µM IPTG und 80 µg/mL X-Gal ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Durch die Zugabe des Antibiotikums wuchsen nur die Zellen, die auch die entsprechende Resistenz durch Aufnahme des Plasmids enthielten. Mit den in den Agarplatten enthaltenen Substanzen IPTG und X-Gal konnte eine sogenannte Blau-Weiß-Selektion durchgeführt werden. Durch das Einfügen eines Inserts in die *multiple cloning site*, welche in dem Gen der β-Galactosidase liegt (*lacZ*-Gen), wurde dieses unterbrochen und das Enzym inaktiviert. Die β-Galactosidase, dessen Genexpression durch den Induktor IPTG eingeleitet wird, kann das Substrat X-Gal nicht mehr in einen blauen Farbstoff (5,5'-Dibromo-4,4'-Dichloro-Indigo) spalten. Daher erscheinen Kolonien, die das gewünschte Insert enthalten weiß, Kolonien ohne Insert jedoch blau. Ob die transformierten Zellen tatsächlich das gewünschte Insert enthielten, wurde durch eine Kolonie-PCR überprüft (siehe Kapitel 4.7.4).

4.7.6 Herstellung von *L. pneumophila* Deletionsmutanten

Konnten mit Hilfe einer Kolonie-PCR Klone nachgewiesen werden, die das gewünschte Deletionskonstrukt enthielten, wurden diese in 5 mL LB-Flüssigmedium über Nacht mit 100 µg/mL Ampicillin bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Am nächsten Tag wurde die angewachsene Kultur für 5 min bei 8000 x g zentrifugiert und das Bakterienpellet für die Plasmidisolation mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) verwendet. Ausgehend von dem isolierten Plasmid wurde anschließend das Deletionskonstrukt mit Hilfe der Q5®-Polymerase und den Primern UFF und DFR in einer PCR vervielfältigt. Nach Aufreinigung des PCR-Produktes mit dem Qiagen PCR Purification Kit

wurde dieses direkt für die Transformation in *L. pneumophila* eingesetzt. Dazu wurde zunächst eine Vorkultur von *L. pneumophila* Corby in 50 mL YEB angesetzt und diese bei 30 °C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 – 1,0 kultiviert. Anschließend wurden 1 mL der Kultur in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt und mit 2-4 µg des Deletionskonstrukts versetzt. Der Ansatz wurde über 3 d bei 30 °C inkubiert und dann auf BCYE-Agarplatten, auf denen das entsprechende Antibiotikum frisch ausgespatelt wurde (7 µg/mL Gentamicin und/oder 20 µg/mL Kanamycin), mindestens 5 d inkubiert. Gewachsene Kolonien wurden mittels Kolonie-PCR überprüft.

4.7.7 Sequenzierung

Um zu überprüfen, ob bei den erzeugten Deletionsmutanten die veränderten DNA-Abschnitte korrekt vorlagen, wurden diese sequenziert. Dazu wurde in einer Kolonie-PCR das Konstrukt mit Hilfe der Q5®-Polymerase und den Primern UFF und DFR vervielfältigt. Anschließend wurden 20 µL des aufgereinigten PCR-Produktes (mit einer DNA-Konzentration von 10-50 ng/µL) zusammen mit den für die Sequenzierung benötigten Primern an die Firma GATC Biotech AG gesandt. Nach Erhalt der Sequenzierdaten wurden diese mit Hilfe der Software Lasergene™ 7 ausgewertet und auf Richtigkeit überprüft.

4.7.8 Klonierung von *L. pneumophila*-Genen für die rekombinante Proteinproduktion

Um *L. pneumophila*-Proteine in größeren Mengen gezielt produzieren zu können, werden die entsprechenden Gene in für die Proteinexpression konzipierte Vektoren eingebracht und anschließend in *E. coli* Produktionsstämme transformiert. Für die Klonierung des *proA*-Gens wurde dieses zunächst mit den Primern *proA_fw* und *proA_rev* in einer PCR mit der Q5®-Polymerase amplifiziert. Die Primer trugen im 5'-Überhang jeweils Restriktionsschnittstellen (*proA_fw*: *NdeI*-Schnittstelle, *proA_rev*: *XhoI*-Schnittstelle), um das Gen hinterher in das Produktionsplasmid einbringen zu können. Im Anschluss wurde das PCR-Produkt mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Der Vektor wurde aus dem *E. coli*-Stamm DH10ß pET-22b(+) mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) isoliert. Anschließend wurde ein Restriktionsverdau mit den Enzymen *NdeI* und *XhoI* von Plasmid und Insert für 1 h bei 37 °C durchgeführt (Tab. 4.49 und 4.50).

4 Material und Methoden

Tabelle 4.49: Zusammensetzung Restriktionsverdau pET-22b(+)

Menge	Substanz
10 µL	Vektor-DNA
5 µL	CutSmart®-Buffer
1,5 µL	<i>NdeI</i>
1,5 µL	<i>XhoI</i>
2 µL	Antarktische Phosphatase
30 µL	Nuklease-freies Wasser
Σ 50 µL	

Tabelle 4.50: Zusammensetzung Restriktionsverdau *proA*-Insert

Menge	Substanz
20 µL	PCR-Produkt
3 µL	CutSmart®-Buffer
1,5 µL	<i>NdeI</i>
1,5 µL	<i>XhoI</i>
4,5 µL	Nuklease-freies Wasser
Σ 30 µL	

Anschließend wurden beide Restriktionsansätze mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt und über Nacht bei 17 °C ligiert (Tab. 4.51).

Tabelle 4.51: Ligationsansatz für die rekombinante Proteinproduktion

Menge	Substanz
2 µL	10 x T4 DNA Ligase Buffer
9 µL	Insert (im Verhältnis 1:3 zum Vektor)
1 µL	Vektor-DNA
1 µL	T4 DNA Ligase
7 µL	Nuklease-freies Wasser
Σ 20 µL	

Der Ligationsansatz wurde am nächsten Tag direkt für die Transformation von *E. coli* DH10ß eingesetzt (siehe Kapitel 4.7.5) und auf LB-Agar mit 100 µg/mL Ampicil-

lin ausplattiert. Gewachsene Kolonien wurden mittels Kolonie-PCR (wie in Kapitel 4.7.4 beschrieben) überprüft und positive Klone, die den pET-22b(+) Vektor mit dem *proA*-Insert trugen, isoliert. Für die Plasmidisolation wurde eine Vorkultur eines positiven Klons in 5 mL LB-Flüssigmedium mit 100 µg/mL Ampicillin angesetzt und bei 37 °C und 200 rpm über Nacht kultiviert. Die Isolierung des Produktionsplasmids erfolgte mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen). Dieses wurde zur Sequenzierung bei der Firma GATC Biotech AG eingeschickt (vergleiche Kapitel 4.7.7). Nach Überprüfung der Richtigkeit der DNA-Sequenz wurde das Plasmid in chemisch-kompetente *E. coli* BL21 eingebracht. Die transformierten Bakterien wurden auf LB-Agar mit 100 µg/mL Ampicillin ausplattiert. Positive Klone wurden wieder mittels Kolonie-PCR identifiziert und isoliert. Diese konnten anschließend direkt für die Produktion von rekombinantem ProA eingesetzt werden.

4.8 Proteinbiochemische Methoden

In den folgenden Unterkapiteln werden die in dieser Arbeit verwendeten biochemischen Methoden beschrieben.

4.8.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Um die Konzentration von Proteinen in einer Lösung oder im Kulturüberstand bestimmen zu können, wurde die Methode nach Bradford mit Roti[®]-Nanoquant angewandt. Dazu wurde die Stammlösung zunächst im Verhältnis 1:5 mit dH₂O verdünnt. Für die Konzentrationsbestimmung in Küvetten wurden 200 µL der 1:20 oder 1:40 verdünnten Proteinlösungen mit 800 µL Arbeitslösung versetzt und nach Messung der optischen Dichte der Quotient aus OD_{590/450} gebildet. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer zuvor erstellten BSA-Eichreihe ermittelt. Bei einer hohen Anzahl an zu messenden Proben wurde die Messung in 96 *well flat bottom*-Platten durchgeführt.

4.8.2 Bestimmung der Proteaseaktivität

Für die Bestimmung der Aktivität von Proteasen in Proteinlösungen oder Kulturüberständen wurde der Azocaseinassay verwendet. Dabei spalten die Proteasen den an das Casein gekoppelte Azofarbstoff ab und die Bestimmung der Proteaseaktivität erfolgt über die optische Dichte. Für die Bestimmung in 96 *well flat bottom*-Platten wurden

4 Material und Methoden

120 μL der zu bestimmenden Proteinprobe mit 1 μL 1 M CaCl_2 -Lösung sowie 30 μL 15 mg/mL Azocasein-Lösung versetzt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proteine durch Zugabe von 75 μL 10 % Trichloressigsäure gefällt und der Ansatz für 20 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 25 min bei 3273 x g. Der den abgespaltenen Azofarbstoff enthaltene Überstand (je 200 μL pro well) wurde in eine neue 96 well flat bottom-Platte überführt und mit 100 μL 10 M NaOH-Lösung alkalisiert. Die Bestimmung der optischen Dichte erfolgte mit Hilfe eines Plattenlesegeräts bei 420 nm. Als Negativkontrolle dienten dabei 200 μL dH_2O mit 100 μL NaOH. Die Höhe der gemessenen OD_{420} korrelierte dabei mit der Proteaseaktivität.

4.8.3 Konzentrierung von Proteinen mittels Amicon® Zentrifugal-Filtereinheiten

Um Proteinlösungen zu konzentrieren, wurden Amicon® Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheiten verwendet. Für die Äquilibration wurden die Filtereinheiten zunächst mit 10 mL Milli-Q® für 15 min bei 8.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Damit die Membran nicht trocken fällt, sollte immer ein wenig Flüssigkeit im Filter zurückbleiben. Anschließend wurde die Membran unter den gleichen Bedingungen mit dem in der Proteinlösung enthaltenen Puffer gewaschen. Nun wurde die Proteinsuspension aufgetragen und in 10 mL-Schritten aufkonzentriert. Bei Bedarf wurde hier die Dauer der Zentrifugation verlängert. Um Proteine umzupuffern, wurden diese im Anschluss fünfmal mit der gewünschten Pufferlösung gewaschen und im Anschluss auf das gewünschte Volumen reduziert. Die aufkonzentrierte Proteinlösung wurde vorsichtig entnommen und bis zur Verwendung bei 4 °C, bzw. -20 °C in 1,5 mL Reaktionsgefäßen gelagert.

4.8.4 Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese

Um Proteine nach ihrer molekularen Masse aufzutrennen, wurde das Verfahren der diskontinuierlichen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) angewandt. Dabei werden Proteine durch Aufkochen mit SDS und β -Mercaptoethanol denaturiert und linearisiert. Weiterhin bindet das anionische SDS an die Proteine und überlagert deren Eigenladung. Die daraus resultierende negative Ladung ist proportional zu der molekularen Masse des Proteins (Laemmli, 1970, Smith, 1984). Für die Durchführung wurden zunächst SDS-Polyacrylamidgele hergestellt. Diese bestanden

für alle Versuche aus je einem 6 %-igem Sammelgel, in welchem die Proteine in einer scharfen Trennlinie aufkonzentriert wurden, und einem 12 %-igem Trenngel, welches zur Trennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht diente (Tab. 4.52 und 4.53). Die Gele wurden in den vorgesehenen Halterungen befestigt, in die Laufkammer gestellt und diese bis zur angegebenen Markierung mit 1 x SDS-Laufpuffer gefüllt (Tab. 4.54).

Tabelle 4.52: Zusammensetzung 6 %-iges Sammelgel für die SDS-PAGE

Menge	Substanz
1,375 mL	Milli-Q®
0,625 mL	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
0,5 mL	30 % (w/v) Acrylamid
25 µL	10 % (w/v) APS
2,5 µL	TEMED

Tabelle 4.53: Zusammensetzung 12 %-iges Trenngel für die SDS-PAGE

Menge	Substanz
1,75 mL	Milli-Q®
1,25 mL	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
2 mL	30 % (w/v) Acrylamid
50 µL	10 % (w/v) APS
5 µL	TEMED

Tabelle 4.54: Zusammensetzung 10 x SDS-Laufpuffer

Menge	Substanz
60,6 g	Tris-Base
288 g	Glycin
20 g	SDS
	mit Milli-Q® auf 2 L auffüllen

Im nächsten Schritt wurden die Proteinproben im Verhältnis 1:4 mit SDS-Ladepuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C erhitzt (Tab. 4.55). Nach dem Abkühlen der Ansätze wurden diese in die Taschen der polymerisierten SDS-Gele gegeben und die

4 Material und Methoden

Gelelektrophorese gestartet. Pro SDS-Gel wurde dabei eine Stromstärke von 45 mA angelegt und der Lauf nach ca. 40 min beendet, sobald der blaue 4 x SDS-Ladepuffer aus dem Gel ausgetreten war. Anschließend wurden die Gele mit Coomassie Silver-Blue, InstantBlue™ oder Silberfärbung gefärbt oder für das Western Blot-Verfahren verwendet.

Tabelle 4.55: Zusammensetzung 4 x SDS-Ladepuffer

Menge	Substanz
30 % (v/v)	Glycerin
15 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
10 % (w/v)	SDS
0,2 % (w/v)	Bromphenolblau
	mit 300 mM Tris-HCl, pH 6,8
	auf das gewünschte Volumen auffüllen

4.8.5 Coomassie Silver-Blue Färbung

Um Proteinbanden auf SDS-Gelen nach der Gelelektrophorese sichtbar zu machen, wurden diese mit der von Candiano et al. im Jahr 2004 beschriebenen kolloidalen Coomassie-Färbung *Blue Silver* gefärbt. Durch ihren hohen Anteil an Phosphorsäure und Coomassie G-250 gilt diese Färbung als sehr sensitiv. Abweichend zu der Veröffentlichung von Candiano et al. wurde in dieser Arbeit Ethanol anstelle von Methanol eingesetzt (Tab. 4.56). Die SDS-Gele wurden über Nacht gefärbt und anschließend mehrmals mit Milli-Q® entfärbt.

Tabelle 4.56: Zusammensetzung Coomassie Silver-Blue Färbelösung

Menge	Substanz
100 mL	Milli-Q®
100 mL	α-Phosphorsäure
100 g	Ammoniumsulfat
	800 mL Milli-Q® hinzufügen
1,2 g	Coomassie-Brilliant-Blau G-250
	frisch dazu:
20 % (v/v)	Ethanol (96 %)

4.8.6 Färbung mit InstantBlue™

Die Färbung von Proteinen auf einem SDS-Gel ist auch mit der Fertiglösung InstantBlue™ (Expedeon) möglich. Die Färbung erfolgt auf Basis einer herkömmlichen Coomassie-Färbung, ist jedoch durch spezielle Zusätze wie Ethanol, Phosphorsäure und weitere, vom Hersteller nicht näher ausgeführte Agenzien sehr sensitiv und schnell. Nach der Gelelektrophorese wurde das SDS-Gel für 15 min bei RT mit InstantBlue™ gefärbt. Die Dokumentation des SDS-Gels erfolgte direkt im Anschluss. Ein Entfärben des Gels war nicht notwendig.

4.8.7 Silberfärbung

Die Silberfärbung dient dem besonders sensitiven Nachweis von Proteinen in einem SDS-Gel. Dazu wurde das Gel zunächst für 0,5 - 2 h in 50 mL Fixierlösung fixiert und im Anschluss zweimal für je 20 min mit 50 %-igem Ethanol (v/v) gewaschen. Dabei kann das SDS-Gel trüb werden. Als nächstes folgte ein kurzer Waschschrift mit Milli-Q®. Anschließend wurde das Gel für 1 min in Sensitizer-Lösung geschwenkt und dann erneut zweimal für 20 s mit Milli-Q® gewaschen. Nun erfolgte das Färben der Proteine. Dazu wurde das Gel für 20 min in 50 mL 1 x Silberlösung geschwenkt. Im Anschluss erfolgten erneut zwei Waschschriffe mit Milli-Q®. Zum Entwickeln des Gels wurde frisch angesetzte Entwicklerlösung hinzugegeben und für 3 - 5 min inkubiert, bis die Proteinbanden deutlich zu erkennen waren. Durch Inkubation für 30 s mit 1 x Stopplösung wurde die Reaktion gestoppt und das gefärbte SDS-Gel anschließend kurz mit Milli-Q® gewaschen. Danach wurde das Gel nochmals für 30 min in 1 x Stopplösung geschwenkt und bis zur Dokumentation in Milli-Q® gelagert (Tab. 4.57).

Tabelle 4.57: Lösungen für die Silberfärbung

Puffer	Menge	Substanz
Fixierlösung	50 % (v/v)	Ethanol
	12 % (v/v)	Essigsäure
	25 µL	frisch dazugeben (auf 50 mL): 37 % (v/v) Formaldehyd
Sensitizer-Lösung	0,1 g	Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O mit Milli-Q® auf 500 mL auffüllen Lösung bei 4 °C aufbewahren

4 Material und Methoden

10 x Silberlösung	10 g	AgNO ₃ mit Milli-Q® auf 500 mL auffüllen
1 x Silberlösung	5 mL 37,4 µL	10 x Silberlösung mit Milli-Q® auf 50 mL auffüllen 37 % Formaldehyd
Entwicklerlösung	1,5 g 1 mL 25 µL	Na ₂ CO ₃ Sensitizer-Lösung mit Milli-Q® auf 50 mL auffüllen 37 % Formaldehyd Lösung immer frisch ansetzen!
5 x Stopplösung	25 g	Glycin mit Milli-Q® auf 500 mL auffüllen

4.8.8 Western Blot und Immunfärbung

Für den spezifischen Nachweis von Proteinen durch Antikörper auf einer Membran wurde ein Western Blot im Semi-Dry-Verfahren durchgeführt. Dazu wurde mit der zu analysierenden Proteinlösung zunächst eine SDS-PAGE (siehe Kapitel 4.8.4) durchgeführt. Das Gel wurde anschließend kurz in Milli-Q® gewaschen und dann für 5-10 min in Towbin-Puffer geschwenkt. Eine auf die Maße des SDS-Gels zugeschnittene PVDF-Membran wurde kurz in Methanol aktiviert und anschließend für 10 min in Towbin-Puffer äquilibriert. Im nächsten Schritt wurden zunächst drei Lagen zugeschnittenes und in Towbin-Puffer getränktes Whatman®-Papier auf der Kathode des Elektrobloppers platziert. Darauf wurde die PVDF-Membran gelegt, anschließend das Polyacrylamidgel und zum Schluss wieder drei Lagen Whatman®-Papier. Eingeschlossene Luftblasen wurden mit einem Blot-Roller vorsichtig entfernt. Dann wurde die Anode aufgelegt, die Kammer verschlossen und bei 1 kV und 25 mA für 18 min geblottet. Im Anschluss wurde die Membran für 1 h in Blockingpuffer geschwenkt. Der primäre Antikörper wurde in Waschpuffer verdünnt und mit der geblockten Membran über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgten drei Waschschritte mit Waschpuffer für je 10 min, bevor der mit Alkalischer Phosphatase gekoppelte Sekundärantikörper aufgetragen wurde. Dieser wurde für alle Versuche 1:10.000 in Waschpuffer verdünnt und für 1 h bei RT schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die PVDF-Membran dreimal für je 10 min mit TBS-T gewaschen und dann für 15 min in

AP-Puffer geschwenkt. Für die Entwicklung des Blots wurden 33 µL BCIP- und 66 µL NBT-Lösung in 5 mL AP-Puffer zu der Membran gegeben und diese inkubiert, bis klare Proteinbanden erkennbar waren. Die Reaktion wurde durch mehrmaliges Waschen in Milli-Q® gestoppt. Der Blot wurde anschließend dokumentiert und auf Filterpapier getrocknet (Tab. 4.58).

Tabelle 4.58: Lösungen für die Western Blot-Analyse

Puffer	Menge	Substanz
10 x Towbin-Puffer	30,3 g 144 g	Tris-Base Glycin mit Milli-Q® auf 1 L auffüllen
1 x Towbin-Puffer	100 mL 200 mL	10 x Towbin-Puffer Methanol mit Milli-Q® auf 1 L auffüllen
TBS-T-Lösung	50 mM 150 mM 0,1 % (v/v)	Tris-HCl, pH 7,6 NaCl Tween 20 mit Milli-Q® auffüllen
Blockingpuffer	5 % (v/v)	Magermilchpulver mit TBS-T-Lösung auffüllen
Waschpuffer	0,5 % (v/v)	Magermilchpulver mit TBS-T-Lösung auffüllen
AP-Puffer	100 mM 100 mM 5 mM	Tris-Base, pH 9,5 NaCl MgCl ₂ x 6 H ₂ O mit Milli-Q® auffüllen

4.8.9 Isolierung von ProA aus *L. pneumophila*

Um natives ProA aus *L. pneumophila* isolieren zu können, wurde zunächst eine Vorkultur in 25 mL YEB-Flüssigmedium angeimpft und über Nacht unter Standardbedingungen inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Hauptkulturen in 1 L Erlenmeyerkolben ohne Schikane mit je 500 mL YEB und 5 mL der angewachsenen Vorkultur angesetzt. Die Kolben wurden über Nacht bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt. Anschließend wur-

4 Material und Methoden

den die Kulturen für 15 min bei 5000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Kulturüberstand wurde mit einem Filtertop (0,2 µm Porengröße) sterilfiltriert.

Aussalzen der Proteine mit Ammoniumsulfat

Die Proteine aus dem Kulturüberstand wurden mit Ammoniumsulfat gefällt. Dazu wurden 373,21 g/L Ammoniumsulfat nach und nach unter ständigem Rühren bei 4 °C zu dem sterilfiltrierten Kulturüberstand hinzugegeben. Die Salzkonzentration betrug nach dem Lösen des kompletten Ammoniumsulfats 60 % (v/v). Die dafür benötigte Menge des Salzes wurde mit Hilfe des „Ammonium Sulfate Calculators“ von EnCor Biotechnology Inc. berechnet. Die Fällung der Proteine erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde der Kulturüberstand für 30 min bei 20.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das erhaltene Proteinpellet wurde in eiskaltem 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 resuspendiert und für die Dialyse verwendet.

Dialyse

Um das Ammoniumsulfat aus der Proteinsuspension zu entfernen, wurde eine Dialyse gegen 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 durchgeführt. Dazu wurde ein Dialyseschlauch (VISKING, MWCO 14 kDa) durch zweimaliges Aufkochen in dH₂O rehydratisiert und gleichzeitig enthaltene Schwermetallionen entfernt. Anschließend wurde der Schlauch mehrmals mit dH₂O gespült und nach dem Einfüllen der Proteinlösung mit Verschlussklemmen abgedichtet. Die Dialyse erfolgte gegen 2 L 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 über Nacht und unter ständigem Rühren bei 4 °C. Durch die Semipermeabilität der Membran können anorganische Salze und andere niedermolekulare Verbindungen entlang des Konzentrationsgefälles in das umgebende Puffermedium austreten, während das Protein zurückbleibt. Anschließend wurde die dialysierte Proteinlösung durch Einlegen des Schlauches in Polyethylenglykol (PEG) aufkonzentriert.

Anionenaustauschchromatographie

Die Aufreinigung von nativem ProA aus dem Kulturüberstand von *L. pneumophila* erfolgte mittels Anionenaustauschchromatographie (Abb. 4.5). Bei diesem Verfahren werden Proteine abhängig von ihrer Nettoladung aufgetrennt und eluiert. Die Trägermatrix der Säule bestand dabei aus immobilisierter Sepharose mit kovalent gebundenem Diethylaminoethyl (DEAE) als funktionelle Gruppe. Damit keine Verunreini-

gungen auf die Säule gelangen, wurden alle verwendeten Lösungen zunächst filtriert (0,45 µm Porengröße). Da die Säule in 20 %-igem Ethanol gelagert wurde, musste sie zunächst mit 5 Säulenvolumen (SV) Milli-Q® gespült werden.

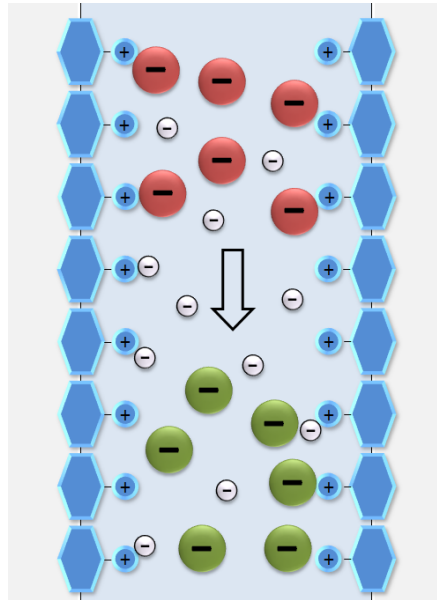


Abbildung 4.5: Schema der Proteinauftrennung durch Anionenaustauschchromatographie. Die in der mobilen Phase befindlichen Chlorid-Anionen (weiß) konkurrieren mit den negativ geladenen Proteinen (rot und grün) um die Bindungsstellen an den positiv geladenen Gruppen der Trägermatrix. Proteine mit schwach-negativer Nettoladung (grün) binden dabei weniger stark an das Säulenmaterial und werden leicht von den Chlorid-Ionen verdrängt. Aus diesem Grund werden diese Proteine als erstes von der Säule eluiert. Proteine mit höherer Negativladung binden entsprechend stärker an die positiv geladene Trägermatrix und werden später von der Säule eluiert. Somit wird eine Trennung von Proteinen entsprechend der Stärke ihrer negativen Ladung erreicht.

Im Anschluss wurde mit 2 SV Waschpuffer äquilibriert und die Proteinlösung auf die Säule gegeben. Proteine mit einer negativen Nettoladung bei pH 7,5 können dabei mit den positiv geladenen DEAE-Gruppen interagieren und an das Säulenmaterial binden. Der Durchfluss wurde separat in einem 50 mL Reaktionsgefäß aufgefangen. Um nicht oder schwach gebundene Proteine zu entfernen, wurde mit 5 SV Waschpuffer gewaschen und die Waschfraktionen jeweils in 15 mL Reaktionsgefäßen aufgefangen. Die Elution erfolgte mit insgesamt 66 mL 1 M NaCl in Waschpuffer. Die Chlorid-Anionen konkurrieren dabei mit den Proteinen um die Bindung an die kovalenten Gruppen und verdrängen diese schließlich. Die Elutionsfraktionen wurden in Fraktionen von je 2 mL aufgefangen und mittels SDS-PAGE (Kapitel 4.8.4) und Western Blot (Kapitel 4.8.8) analysiert. Alle Fraktionen wurden anschließend bei 4 °C gelagert. Die Reinigung der Säule erfolgte mit 2 SV Regenerationspuffer, um mögliche verbleibende Proteine zu

4 Material und Methoden

entfernen. Im Anschluss wurde die Säule mit 4 SV Milli-Q[®] gewaschen und in 20 %igem Ethanol bei 4 °C gelagert (Tab. 4.59).

Tabelle 4.59: Lösungen für die Anionenaustauschchromatographie

Puffer	Menge	Substanz
Waschpuffer	20 mM	Tris-HCl, pH 7,5
Elutionspuffer	20 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	1 M	NaCl
Regenerationspuffer	0,1 M	NaOH
	0,5 M	NaCl

4.8.10 Produktion und Reinigung von rekombinantem ProA

Für die Produktion von rekombinantem ProA in *E. coli* wurde zunächst eine Vorkultur des Expressionsstammes BL21-pET22b(+)-*proA* (siehe Kapitel 4.7.8) in TB-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin angesetzt und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Hauptkulturen angesetzt. Dazu wurden zwei 1 L Schikane Kolben mit je 500 mL TB-Medium befüllt und mit 100 µg/mL Ampicillin versetzt. Die Hauptkulturen wurden im Verhältnis 1:20 mit der Vorkultur angeimpft und bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer OD₅₅₀ von 0,5-0,8 angezogen. Die Expression von *proA* wurde durch Zugabe von 0,02 % α -Lactose (w/v) und 5 mM MgSO₄ induziert. Die Produktion erfolgte über Nacht bei 30 °C und 180 rpm. Da ProA bei der rekombinanten Produktion in *E. coli* im Periplasma des Bakteriums lokalisiert ist, wurde die periplasmatische Fraktion isoliert. Dazu wurde die Hauptkultur zunächst bei 5.000 x g und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in dem Waschpuffer resuspendiert, welcher für die jeweilig verwendete Chromatographie-Methode benötigt wurde. Für die Isolierung der periplasmatischen Fraktion wurde das Antibiotikum Polymyxin B verwendet, welches die äußere Membran Gram-negativer Bakterien destabilisiert. Das Polymyxin B wurde in einer Konzentration von 2 mg/mL zu der Bakteriensuspension gegeben und für 2 h bei 4 °C auf dem Rollschüttler inkubiert. Im Anschluss wurde für 30 min bei 4 °C und 8.000 x g zentrifugiert und der Überstand sterilfiltriert. Für die Aufreinigung von rekombinantem ProA wurden verschiedene chromatographische Verfahren angewandt, die in den folgenden Unterkapiteln erläutert sind.

Affinitätschromatographie mit Protino® Ni-TED Tropfsäulen

Eine einfache und schnelle Methode zur Aufreinigung von His₆-getaggten Proteinen ist die Verwendung von Tropfsäulen nach dem IMAC-Verfahren (*immobilized metal ion affinity chromatography*). Für die Aufreinigung von ProA-His₆ wurde eine Tropfsäule mit Tris(carboxymethyl)ethylendiamin (TED) als Nickel-chelatierenden Liganden eingesetzt (Macherey-Nagel). In Abbildung 4.6 ist die Auftrennung von Proteinen mittels Nickel-Chelat-Chromatographie dargestellt.

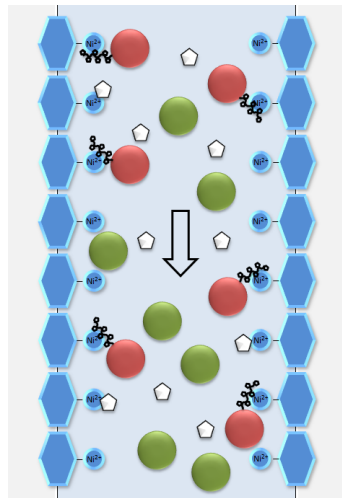


Abbildung 4.6: Schema der Proteinauftrennung mittels Nickel-Chelat-Chromatographie. Rekombinant produzierte und mit einem His-Tag versehene Proteine können mittels Affinitätschromatographie aufgetrennt werden. Die Trägermatrix (blau) ist hierbei mit einem Nickel-chelatierenden Liganden versehen. Die Aminosäure Histidin bindet spezifisch an die Nickel-Ionen und das rekombinante Protein (rot) somit an das Säulenmaterial. Nicht mit einem His-Tag versehene Proteine können dagegen nicht bzw. deutlich schwächer binden. Die Elution erfolgt mit Imidazol (weiß), welches die rekombinanten Proteine von den Bindungsstellen verdrängt

Entsprechend der Herstellerangaben wurde die Säule zunächst mit 4 mL 1 x LEW-Puffer äquilibriert. Anschließend wurde die filtrierte Proteinsuspension aufgetragen und der Durchfluss in einem 50 mL Schraubgefäß aufgefangen. Um nicht gebundene Proteine zu entfernen, wurde die Säule dreimal mit je 4 mL 1 x LEW-Puffer gewaschen und die Waschfraktionen separat in 15 mL Schraubgefäßen aufgefangen. Um das gebundene ProA wieder von der Säule zu eluieren, wurde je mit 6 x 1 mL 1 x Elutionspuffer eluiert. Dieser enthielt Imidazol, welches den His₆-Tag von ProA kompetitiv aus dem Chelatkomplex verdrängt. Die Elutionsfraktionen wurden jeweils in 1,5 mL Reaktionsgefäßen gesammelt. Alle Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Fraktionen, die reines ProA enthielten, wurden mit Hilfe von

4 Material und Methoden

Amicon[®] Zentrifugaleinheiten (siehe Kapitel 4.8.3) umgepuffert und aufkonzentriert.

Affinitätschromatographie mit FPLC

Um die Aufreinigung von rekombinantem ProA zu optimieren, wurde, in Kooperation mit Dr. Konrad Büssow aus der Abteilung für Rekombinante Proteinexpression (RPEX) am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI), eine Affinitätschromatographie mittels FPLC (*fast protein liquid chromatography*) an einem ÄKTA-System durchgeführt. Hierbei wurde eine His-Trap[™] HP-Säule verwendet, an deren Sepharosematrix Nickel-Ionen immobilisiert waren. Das Aufreinigungsprinzip entsprach dabei der in dem vorherigen Unterkapitel genannten Protino[®] Ni-TED Tropfsäulen. Damit keine Luftblasen oder Verunreinigungen in das ÄKTA-System oder auf die Säule gelangten, wurden alle verwendeten Puffer vor Verwendung filtriert und mittels Ultraschallentgast (Tab. 4.60). Da die Säule auf 20 %-igem Ethanol lagerte, wurde diese zunächst mit 10 SV Milli-Q[®] (1 mL/min) gewaschen. Anschließend wurde die Säule mit 10 SV Waschpuffer 1 äquilibriert und die periplasmatische Fraktion aufgetragen. Der Durchfluss wurde in einem 50 mL Schraubgefäß aufgefangen. Um nicht oder schwach gebundene Proteine zu entfernen, wurde die Säule mit 10 SV Waschpuffer 1 gewaschen. Für die Elution wurde ein Gradient von 8-100 % Waschpuffer 2 in 10 SV Schritten verwendet. Die Eluate wurden in 1 mL-Fractionen in 96-Deepwell-Platten aufgefangen und anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Danach wurde die Säule mit 5 SV Elutionspuffer und Waschpuffer 1 reäquilibriert und im Anschluss mit Milli-Q[®] gewaschen. Die Reinigung erfolgte mit 5-10 SV Regenerationspuffer und nachfolgendem Waschen mit Milli-Q[®]. Für eine komplette Regeneration wurden die Nickel-Ionen mittels Stripping-Puffer eluiert und die Säule nach mehrmaligem Spülen mit Regenerationspuffer erneut mit 1-2 mL 0,1 M NiSO₄-Lösung beladen. Nach Waschen mit Milli-Q[®] wurde die Säule auf 20 %-igem Ethanol bei 4 °C gelagert.

Tabelle 4.60: Lösungen für die Affinitätschromatographie

Puffer	Menge	Substanz
Waschpuffer 1	50 mM	NaH ₂ PO ₄
	300 mM	NaCl
	10 % (v/v)	Glycerin
		mit NaOH auf pH 8,0 einstellen

Waschpuffer 2	50 mM 5 % (v/v)	NaH ₂ PO ₄ Glycerin mit NaOH auf pH 8,0 einstellen
Elutionspuffer	50 mM 250 mM 5 % (v/v)	NaH ₂ PO ₄ Imidazol Glycerin mit NaOH auf pH 8,0 einstellen
Regenerationspuffer	1 M 2 M	NaOH NaCl
Stripping-Puffer	50 mM 300 mM 500 mM	NaH ₂ PO ₄ NaCl EDTA mit NaOH auf pH 8,0 einstellen

Hydrophobe Interaktionschromatographie

Um rekombinant produziertes ProA nach der Affinitätschromatographie weiter aufzureinigen, wurde eine hydrophobe Interaktionschromatographie durchgeführt. Dafür wurde eine 1 mL HiTrap[®] Octyl FF-Säule verwendet, deren Trägermatrix hydrophobe Octylgruppen als Liganden gebunden hat (Abb. 4.7).

Bevor mit der Aufreinigung begonnen werden konnte, wurden die Eluate der Affinitätschromatographie, die ProA enthielten, vereinigt und auf eine Ammoniumsulfat-Konzentration von 1 M eingestellt. Die Säule wurde mit 10 SV Milli-Q[®] bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 mL/min gewaschen, um das für die Lagerung verwendete Ethanol zu entfernen. Im Anschluss wurde die Säule mit 10 SV Äquilibrationpuffer gespült und die Proteinsuspension aufgetragen. Dabei kommt es zu hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und den Octylgruppen der Trägermatrix. Je höher dabei der Anteil an hydrophoben Bereichen auf der Proteinoberfläche ist, desto stärker ist die Bindung an die Säule. Der Durchfluss wurde in einem 50 mL Schraubgefäß aufgefangen. Um nicht oder schwach gebundene Proteine zu entfernen, wurde mit 10 SV Puffer A gewaschen. Die Waschfraktion wurde ebenfalls in einem 50 mL Schraubgefäß aufgefangen. Für die Elution wurde die Salzkonzentration in der mobilen Phase verringert, um die Hydrathüllen der Proteine nach und nach wiederherzustellen. Dazu wurde ein Konzentrationsgradient über 20 SV angelegt, der bei

4 Material und Methoden

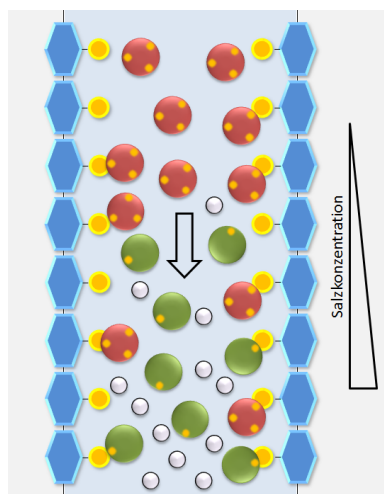


Abbildung 4.7: Schema der Proteinauftrennung durch hydrophobe Interaktionschromatographie. Durch eine hohe Salzkonzentration (weiß) in der mobilen Phase werden die hydrophoben Bereiche (orange) der Proteine freigelegt. Diese können dann mit den hydrophoben Gruppen der Säulenmatrix (gelbe Kreise) interagieren. Je höher dabei die Hydrophobizität des Proteins ist, desto stärker ist auch die Wechselwirkung mit der stationären Phase. Für die Elution wird die Salzkonzentration gesenkt, wodurch die hydrophoben Bereiche der Proteine wieder durch die Hydrathülle verdeckt werden. Proteine mit niedrigerer Hydrophobizität (grün) eluieren dabei früher als Proteine mit höherer Hydrophobizität (rot).

100 % Puffer A begann und bei 100 % Puffer B endete. Die Elution mit Puffer B erfolgte zusätzlich über weitere 5 SV. Alle Elutions-Fraktionen wurden zu je 1 mL in 96-Deepwell-Platten gesammelt und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Im Anschluss wurde die Säule mit 10 SV Puffer A gewaschen und mit 5 SV Regenerierungspuffer gereinigt. Nach dem Waschen mit Milli-Q® wurde die Säule auf 20 %igem Ethanol bei 4 °C gelagert (Tab. 4.61).

Tabelle 4.61: Lösungen für die hydrophobe Interaktionschromatographie

Puffer	Menge	Substanz
Äquilibrierungspuffer	50 mM	NaH ₂ PO ₄
	250 mM	Imidazol
	1 M	Ammoniumsulfat
	5 % (v/v)	Glycerin mit NaOH auf pH 8,0 einstellen
Puffer A	20 mM	Tris-HCl
	1 M	Ammoniumsulfat mit HCl auf pH 7,5 einstellen

Puffer B	20 mM 50 % (v/v)	Tris-HCl Ethylenglykol mit HCl auf pH 7,5 einstellen
Regenerationspuffer	1 M 2 M	NaOH NaCl

Gelfiltrationschromatographie

Für die weitere Aufreinigung von rekombinantem ProA wurde das Verfahren der Gelfiltrationschromatographie angewandt (Abb. 4.8). Dafür wurde ein ÄKTA-System unter Verwendung einer HiLoad® 16/600 Superdex 200 pg eingesetzt. Das Säulenmaterial besteht aus einem porösen Trägermaterial aus quervernetzter Agarose mit kovalent gebundenem Dextran. Der optimale Trennbereich liegt bei einem Molekulargewicht zwischen 10 und 600 kDa. Die für die Chromatographie eingesetzten Lösungen wurden vor Verwendung entgast und filtriert. Die ProA-haltigen Fraktionen aus der hydrophoben Interaktionschromatographie wurden mit Hilfe eines 20 mL 10.000 MWCO Vivaspin-Konzentrators auf ein Volumen von 1 mL reduziert (vergl. Kap. 4.8.3). Vor Verwendung der Säule wurde diese mit 1-2 SV Milli-Q® gewaschen und anschließend mit Gelfiltrationspuffer äquilibriert. Die Auftrennung bei der Gelfiltration erfolgt nach der Proteingröße. Dabei können kleinere Proteine besser in die Poren der Säulenmatrix eindringen und eluieren dadurch später als größere Proteine. Die Auftrennung erfolgte hier mit 1,5 SV Gelfiltrationspuffer. Die Proteinfraktionen wurden zu je 2 mL in 96-Deepwell-Platten gesammelt und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Die Reinigung der Säule erfolgte mit 1 SV Regenerationspuffer. Im Anschluss wurde die mit Milli-Q® gespült und auf 20 %-igem Ethanol bei 4 °C gelagert (Tab. 4.62).

Tabelle 4.62: Lösungen für die Gelfiltrationschromatographie

Puffer	Menge	Substanz
Gelfiltrationspuffer	20 mM 10 mM 10 % (v/v)	Tris-HCl EDTA Glycerin mit HCl auf pH 7,5 einstellen
Regenerationspuffer	1 M 2 M	NaOH NaCl

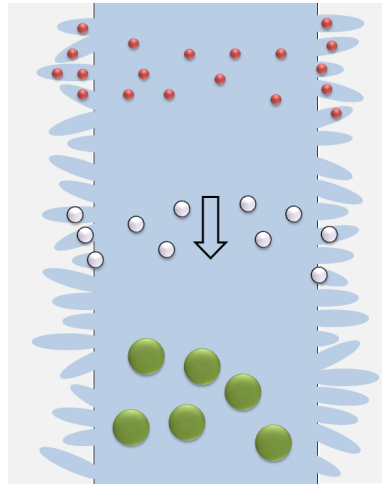


Abbildung 4.8: Schema der Auftrennung mittels Gelfiltrationschromatographie. Durch das poröse Trägermaterial entstehen Poren unterschiedlicher Größen. Kleinere Proteine können besser in diese Poren eindringen als größere und werden dadurch später eluiert. Es erfolgt somit eine Auftrennung über die Größe der Proteine.

4.8.11 Kristallisation von ProA

Erste Kristallisationsversuche wurden ebenfalls am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Kooperation mit Dr. Konrad Büssow aus der Abteilung für Rekombinante Proteinexpression (RPEX) durchgeführt. Zunächst wurden dafür die ProA-enthaltenden Fraktionen nach der Gelfiltrationschromatographie mittels eines 4 mL Vivaspin-Konzentrators (10.000 MWCO) aufkonzentriert. Die konzentrierte Proteinsuspension wurde für 20 min bei $109.000 \times g$ und 4°C zentrifugiert, um Verunreinigungen und ausgefallenes Protein zu entfernen. Für die Kristallisation wurde die sogenannte *Sitting-Drop*-Methode angewandt (Abb. 4.9). Dabei wird ein Tropfen mit der hoch konzentrierten Proteinlösung in ein Reservoir seitlich des Gefäßes mit dem Fällungsmittel gegeben. Als Fällungsmittel dienen unterschiedliche Pufferlösungen mit hohen Konzentrationen an z.B. Salzen, Alkoholen oder Polyethylenglykol. Durch die langsame Diffusion des Wassers über die Gasphase aus der Proteinlösung entlang des Konzentrationsgefälles in Richtung Fällungsmittel kommt es zu einer Übersättigung der Proteinsuspension und es können sich Kristallkeime bilden. Für die Kristallisation wurden ProA-Konzentrationen von 4,9 mg/mL, 9,4 mg/mL und 21,2 mg/mL eingesetzt. Als Fällungsmittel wurden verschiedene Kristallisationsscreening-Sets mit jeweils 96 unterschiedlichen Bedingungen verwendet (Index, MIDAS, Morpheus, COMPAS, Cryos, JCSG+, JCSG Core I, JCSG Core II, JCSG Core III, JCSG Core IV,

PACT). Die Beladung der Reservoirs erfolgte mit einem Pipettierroboter, wobei in die Gefäße der 96-*well*-Kristallisationsplatte je 70 μL des entsprechenden Fällungsmittels gegeben wurden und in den Reservoirs je 0,2 μL der Proteinlösung mit 0,2 μL des Fällungsmittels gemischt wurden. Die Kristallisationsansätze wurden mit luftdurchlässiger Folie abgedeckt und bei 20 °C in einem automatisierten Klimaschrank inkubiert. Die Platten wurden nach 0 h, 12 h, 24 h, 3 d, 5 d, 8 d und danach alle zwei Wochen gescannt und auf Kristallbildung untersucht.

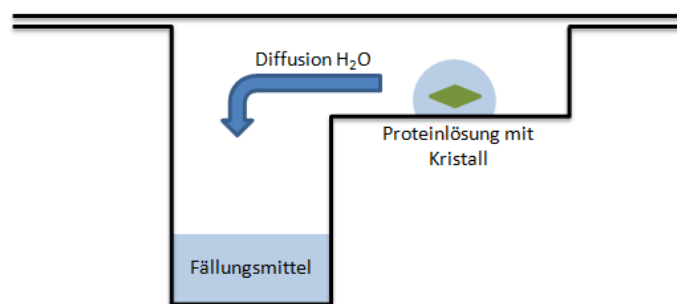


Abbildung 4.9: Schematische Darstellung der *Sitting-Drop*-Kristallisation. Bei dieser Methode der Proteinkristallisation befindet sich das Fällungsmittel in dem größeren, unteren Reservoir. Die hoch konzentrierte Proteinlösung befindet sich in dem kleineren, oberen Reservoir. Über die Gasphase diffundiert Wasser aus der Proteinlösung entlang des Konzentrationsgefälles in Richtung des Fällungsmittels. Dadurch steigen allmählich die Konzentrationen von Protein und Präzipitant. Durch die Übersättigung können sich Kristallkeime bilden.

4.8.12 Isolierung des Sekretoms mittels TCA-Fällung

Um das Sekretom von *L. pneumophila* genauer zu analysieren, wurden 50 mL Kulturen von *L. pneumophila* Corby WT und *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ in YEB oder CDM, bei Bedarf mit verschiedenen Zusätzen (1 $\mu\text{g/mL}$ Casein, Proteinextrakte aus humanem Lungengewebe, bzw. THP-1-Zellen) oder in CDM ohne Calcium, angesetzt und bei Standardbedingungen über Nacht bis zum Erreichen der stationären Phase kultiviert. In YEB lag die OD_{600} dabei bei 3,0 - 3,4, in CDM bei 1,8 - 2,2. Die Kulturen wurden für 15 min bei 5.000 x g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand mittels 0,2 μm -Filter sterilfiltriert. 45 mL des sterilen Kulturüberstands wurden mit 5 mL 100 %-iger Trichloressigsäure (TCA) versetzt und die Proteine über Nacht bei 4 °C gefällt. Am nächsten Tag wurde die Proteinsuspension für 2 h bei 8.000 x g und 4 °C

4 Material und Methoden

zentrifugiert und das Pellet in 10 mL eiskaltem EtOH (abs.) resuspendiert. Anschließend wurden die gefällten Proteine für 20 min bei 8.000 x g und 4 °C zentrifugiert und in 2 mL EtOH abs. resuspendiert. Die Proteinlösung wurde in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt für 8 min bei 12.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde fünfmal wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Proteinpellet in 2 mL 70 %-igem Ethanol resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet über Nacht bei 4 °C mit geöffnetem Deckel getrocknet. Das Proteinpellet wurde in Rehydratisierungspuffer A aufgenommen und nach dem Lösen bei -20 °C eingefroren (Tab. 4.63). Die Proteinkonzentration wurde mittels Roti®-Nanoquant vermessen und die Proteine des Sekretoms mittels SDS-PAGE und Western Blot, 2D-Gelelektrophorese oder Massenspektrometrie analysiert.

Tabelle 4.63: Zusammensetzung Rehydratisierungspuffer A

Menge	Substanz
7 M	Harnstoff p.a.
2 M	Thioharnstoff p.a.
4 % (w/v)	CHAPS
50 mM	DTT
	in Milli-Q® lösen, bei -20 °C lagern

4.8.13 2D-Gelelektrophorese

Um die Sekretome von *L. pneumophila* Corby WT und *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ genauer zu untersuchen und miteinander zu vergleichen, wurde eine 2D-Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu sollten die mittels TCA-Fällung (siehe Kapitel 4.8.12) aus dem Sekretom isolierten Proteine möglichst in CHAPS-freiem Rehydratisierungspuffer A gelöst werden, um scharfe Spots auf dem Gel zu erhalten. Bei der 2D-Gelelektrophorese werden die Proteine im ersten Schritt mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF) nach ihrem pI-Wert aufgetrennt (erste Dimension). In der zweiten Dimension erfolgt die Auftrennung nach dem Molekulargewicht. Von den Sekretomproben wurden für die Durchführung jeweils 200 µg Protein eingesetzt. Der Nachweis der Protein-Spots auf den Gelen erfolgte mittels Silberfärbung. Der 1:1 2D-Vergleich wurde von der Firma Proteome Factory AG aus Berlin durchgeführt.

4.8.14 Identifikation von Proteinen via Massenspektrometrie

Für die Identifikation der Proteine und den Vergleich der Sekretomproben von *L. pneumophila* Corby WT und *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ wurden Kulturen in 50 mL YEB-Medium angesetzt und bis zu einer OD₆₀₀ von 3,0 wachsen gelassen. Am nächsten Tag wurde eine TCA-Fällung der Kulturüberstände (vergl. Kapitel 4.8.12) durchgeführt und die Proteine in jeweils 200 µL 8 M Harnstoff und 2 M Thioharnstoff resuspendiert. Für eine statistische Aussage der Ergebnisse wurden die Proben in drei unabhängigen Ansätzen präpariert. Die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen fand in Kooperation mit der Arbeitsgruppe „Mikrobielle Proteomik“ von Prof. Dr. Susanne Engelmann statt. Zunächst wurde die Proteinkonzentration der Sekretomproben mit Roti®-Nanoquant vermessen und eine SDS-PAGE durchgeführt. Dafür wurden 20 µg Protein der *L. pneumophila* Corby WT-Probe aufgetragen. Von der *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ -Probe wurde ein zu der Wildtyp-Probe äquivalentes Volumen eingesetzt, um die Unterschiede im Sekretom bei gleicher Wachstumsphase analysieren zu können. Die SDS-Gelelektrophorese wurde bei 15 mA pro Gel für ca. 1,5 h durchgeführt, bis die Bromphenolblau-Front den Rand des Gels erreicht hatte. Die Färbung der Proteinbanden wurde mit Coomassie Silver-Blue durchgeführt und die Gele eingescannt. Mit der Software AIDA Image Analyzer von Raytest wurden die Sekretomspuren in acht Stücke unterteilt, die die gleiche Menge an Protein enthalten sollten. Mit Hilfe des verwendeten Protein-Standards, dessen zweite Markerbande genau 0,5 µg BSA enthielt, wurden die Proteinmengen der einzelnen Teilstücke berechnet. Auf einer Glasplatte und mit Hilfe eines Skalpell wurden die Gelstücke ausgeschnitten und diese anschließend nochmal in ca. 1 x 1 mm große Stücke unterteilt. Die kleinen Gelstücke wurden nach den zuvor ausgewählten Teilstücken je in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und 200 µL Milli-Q® hinzugegeben. Bis zur weiteren Verarbeitung konnten die Gelstücke bei -20 °C gelagert werden.

Tryptischer In-Gel-Verdau der Proteine

Nach dem Auftauen der Gelstücke wurde das Milli-Q® vorsichtig mit einer Mikroliter-Pipette abgezogen und durch 100 µL Entfärbelösung ersetzt und für einige Stunden oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Dazwischen sollte die sich blau färbende Lösung immer wieder erneuert und die Reaktionsgefäße vorsichtig geschüttelt werden. Am nächsten Tag sollten alle Gelstücke entfärbt sein. Im nächsten Schritt wurden die Gelstücke kurz in Acetonitril (ACN) gewaschen und anschließend darin inkubiert, bis

4 Material und Methoden

die Stücke weiß geworden waren. Durch diesen Vorgang wurden die Gelstücke entwässert. Im Anschluss wurde das ACN vorsichtig abgezogen, durch 2 x $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ ersetzt und die Gelstücke für 5 min inkubiert und rehydratisiert. Danach folgte wieder ein einminütiger Entwässerungsschritt in ACN. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt und die Proben im Anschluss so lange in ACN inkubiert, bis sie sich weiß gefärbt hatten. Um die Disulfidbrücken innerhalb der Proteine zu reduzieren, erfolgte nun ein Inkubationsschritt in 120 μL frisch angesetzter DTT-Lösung in einem Wasserbad bei 60°C für 30 min. Im nächsten Schritt wurden die Proben zweimal für 1 min in ACN inkubiert. Dabei sollte eine Inkubationszeit von 3 min nicht überschritten werden, damit sich die Disulfidbrücken der Proteine nicht wieder ausbilden können. Nun wurden die Gelstücke für 1 h in 120 μL IAA-Lösung bei RT im Dunkeln inkubiert. Dabei wurden die Cysteine der Proteine alkyliert und die Disulfidbrücken bleiben irreversibel gespalten. Im Anschluss erfolgte ein kurzer Waschschrift in ACN. Danach wurden die Proben für 5 min in 2 x $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ inkubiert, gefolgt von einer einminütigen Inkubation in ACN. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt und die Gelstücke im letzten Schritt wiederholt für 1 min in ACN inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei RT für 45 min bis zu 2 h unter einem Abzug bei geöffnetem Deckel getrocknet. Nun wurden 150 μL Trypsin-Lösung in einem Mengenverhältnis von 1:10 (Trypsin : Probe, (w/w)) zu den Gelstücken gegeben. Dabei wurden zunächst 120 μL der Trypsin-Lösung zu den Proben hinzugegeben und die Gelstücke für 30 min bei 4 °C aufquellen gelassen. Wenn nötig, wurden die restlichen 30 μL der Lösung addiert, um alle Gelstücke zu bedecken. Im Anschluss wurden die Proben bei 37 °C über Nacht verdaut. Am nächsten Tag wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und dieser, sowie alle Überstände der folgenden Schritte, in separaten 2 mL Reaktionsgefäßen gesammelt. Zunächst wurden 120 μL ACN zu den Proben hinzugegeben und für 5 min inkubiert. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt. Anschließend wurden die Gelstücke zunächst in 150 μL 1 %-iger Ameisensäure und, nach einem wiederholten ACN-Schritt, in 150 μL 10 %-iger Ameisensäure jeweils für 10 min inkubiert. Dadurch wurden die Peptide aus den Gelstücken extrahiert. Zum Schluss erfolgten zwei weitere Inkubationsschritte mit ACN. Die gesammelten Überstände wurde in einer Speedvac bei 30 °C rotiert, bis sie komplett getrocknet waren. In Tabelle 4.64 sind die für den In-Gel-Verdau verwendeten Lösungen aufgeführt.

Tabelle 4.64: Lösungen für den In-Gel-Verdau

Lösung	Menge	Substanz
Entfärbelösung	50 % (v/v) 50 % (w/v)	Methanol p.a. 1 x (NH ₄)HCO ₃
1 x (NH ₄)HCO ₃	25 mM	(NH ₄)HCO ₃ , pH 7,8
2 x (NH ₄)HCO ₃	50 mM	(NH ₄)HCO ₃ , pH 7,8
DTT-Lösung	10 mM	Dithiothreitol in 2 x (NH ₄)HCO ₃ lösen
IAA-Lösung	50 mM	Iodacetamid in 2 x (NH ₄)HCO ₃ lösen
Trypsin-Lösung	50 mM 1 mM	Tris-HCl, pH 7,6 CaCl ₂ x 2 H ₂ O Trypsin im Verhältnis 1:10 (w/w) entsprechend der Proteinmenge hinzufügen

Entsalzen und Aufkonzentrieren via Zip Tips

Nach dem Trocknen der Proben wurden diese zunächst in 20 µL Waschlösung resuspendiert und für 60 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Peptidproben durch vortexen gemischt und für einige Sekunden zentrifugiert, um die Flüssigkeit am Boden des Reaktionsgefäßes zu konzentrieren. Die Zip Tips (µ-C18) wurden dreimal mit je 10 µL Äquilibrationlösung befeuchtet, wobei keine Luft in die Spitzen eingezogen werden durfte. Anschließend wurden die Zip Tips zweimal mit Waschlösung gewaschen und der Durchfluss verworfen. Nun wurden 10 µL der Probe durch mehrmaliges Pipettieren aufgenommen, wobei die Peptide an die Matrix der Zip Tips binden. Die Peptide wurden im Anschluss dreimal mit Waschlösung gewaschen und dabei der Durchfluss verworfen. Durch mehrmaliges Pipettieren von 10 µL Elutionspuffer in ein steriles 1,5 mL Reaktionsgefäß wurden die Peptide wieder eluiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurden die Peptidproben in einer Speevac rotiert, bis sie komplett trocken waren. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C. In Tabelle 4.65 sind die verwendeten Lösungen aufgeführt.

Tabelle 4.65: Lösungen für die Zip Tip-Entsalzung

Lösung	Menge	Substanz
Äquilibrierungslösung	50 % (v/v)	Acetonitril
Waschlösung	5 % (v/v)	Acetonitril
	0,1 % (v/v)	Ameisensäure
Elutionspuffer	60 % (v/v)	Acetonitril
	0,1 % (v/v)	Ameisensäure

Präparation für die Analyse via Orbitrap

In Vorbereitung zur Analyse der Peptide mittels Orbitrap wurden die Proben zunächst in je 16 µL Puffer A für 60 min bei RT inkubiert und dadurch gelöst (Tab. 4.66). Im Anschluss wurden die Proben für 5 min in einem Ultraschallbad bei 37 kHz sonifiziert. Dabei sollte die Temperatur 30 °C nicht übersteigen. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt wurden die gelösten Peptide in Röhrchen für die Ultrazentrifugation überführt und 20 min bei 50.000 rpm und RT zentrifugiert. Die Überstände wurden in Glassgefäße überführt und von Dr. Martin Kucklick aus der Arbeitsgruppe "Mikrobielle Proteomik am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung via Orbitrap analysiert und ausgewertet.

Tabelle 4.66: Zusammensetzung Puffer A

Menge	Substanz
0,1 % (v/v)	Ameisensäure
3 % (v/v)	Acetonitril

4.8.15 Messung der CXCL8-Konzentration mittels ELISA

Für die Messung von Konzentrationen des Chemokins CXCL8 in Kulturüberständen von HLTE-Infektionen (siehe Kapitel 4.6.3) wurde das ELISA-Kit "DuoSet®" der Firma R & D Systems für humanes CXCL8/IL-8 verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß der Herstellerangaben. Die Messung der optischen Dichte erfolgte in einem Plattenlesegerät bei 450 nm und 540 nm. Für eine Wellenlängen-Korrektur wurde die OD₅₄₀ von der OD₄₅₀ abgezogen.

5 Ergebnisse

5.1 Optimierung von Produktion und Reinigung der Zink-Metalloprotease ProA

Die Kristallstruktur der *L. pneumophila*-Protease ProA ist bisher noch nicht entschlüsselt. In Hinblick auf die Kristallisation des potentiellen Virulenzfaktors wurden verschiedene Produktionsbedingungen und Reinigungsverfahren getestet. In den folgenden Unterkapiteln sollen nur die Ergebnisse der geeignetsten Verfahren detailliert dargestellt werden. Weitere getestete Systeme und Bedingungen sind in Tabelle 5.1 aufgelistet.

Tabelle 5.1: Weitere getestete Expressionssysteme

Plasmid/ Tag	Stamm	Induktion	Prod.	Anmerkung
pET52b(+), Strep-Tag	Rosetta-gami 2	IPTG	+	ProA unlöslich im Cytoplasma
		α -Lactose	+	
	BL21	IPTG	+	
		α -Lactose	+	
pET19b(+), His-Tag	Rosetta-gami 2	IPTG	-	
		α -Lactose	-	
	BL21	IPTG	-	
		α -Lactose	-	
pET19b(+) -sidC-His	Rosetta-gami 2	IPTG	-	
		α -Lactose	-	
	BL21	IPTG	-	
		α -Lactose	-	
pMAL, MBP-His	Rosetta-gami 2	IPTG	+	Keine Trennung von ProA und MBP-His möglich
		α -Lactose	+	
	BL21	IPTG	+	
		α -Lactose	+	
	<i>L. pneumophila</i> Corby proA- Strep		+	Aufreinigung über Strep- Tactin-Säule nicht möglich
			+	
			+	
			+	

5.1.1 Isolierung von nativem ProA aus *L. pneumophila*

Für die Isolierung von nativem ProA aus *L. pneumophila* wurden die Proteine des Kulturüberstandes einer 1 L-Kultur mit 60 % (w/v) Ammoniumsulfat über Nacht gefällt. Nach einem Zentrifugationsschritt wurden die Proteine in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 resuspendiert und dialysiert. Die Auftrennung erfolgte mittels Anionenaustauschchromatographie (AEC), wobei die Proteine anhand ihrer Ladung separiert wurden. Dafür wurde eine Tropfsäule mit DEAE-Säulenmaterial verwendet. Die Elution erfolgte mit 1 M NaCl in Waschpuffer (siehe Tabelle 4.59) in insgesamt 32 Fraktionen von jeweils 2 mL. In Abbildung 5.1 sind die Coomassie Silver Blue-gefärbten SDS-Gele und die Western Blot-Analysen der Aufreinigung dargestellt.

Im Durchfluss (2) und den Waschfraktionen (3-7) waren auf dem SDS-Gel keine Proteinbanden zu sehen, was vermuten lässt, dass alle in der Proteinprobe befindlichen Proteine an die DEAE-Säule gebunden hatten. Auch in den ersten drei Elutionsfraktionen ließen sich noch keine Proteine feststellen, was auf das größere Säulenvolumen zurückzuführen ist. Ab Fraktion 11 konnten Proteine auf dem SDS-Gel detektiert werden. Dabei war zunächst eine große Ähnlichkeit des Bandenmusters zu dem der Proteinprobe (1) zu erkennen. Daraus lässt sich schließen, dass ein Großteil der in der Probe befindlichen Proteine bereits früh von der Säule eluiert wurde. Ab Fraktion 19 der Elution konnte auf dem SDS-Gel nur noch eine einzelne Bande knapp unter Höhe der 40 kDa-Markerbande nachgewiesen werden. Anhand des Western Blots und Detektion mit dem spezifischen anti-ProA-Antikörper (PHK101-D5) wurde die Proteinbande als ProA identifiziert. Das Protein konnte bis Fraktion 40 in den Elutionsfraktionen nachgewiesen werden. Die Fraktionen, die das reine Protein enthielten, wurden vereinigt und mittels Amicon® Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheit (siehe Kapitel 4.8.3) auf ein Volumen von 1 mL aufkonzentriert. Die Proteinkonzentration wurde via Bradford-Assay mit Roti®-Nanoquant (siehe Kapitel 4.8.1) bestimmt. Aus 1 L Kulturüberstand von *L. pneumophila* konnten letztendlich ca. 1 mg reines ProA gewonnen werden. Eine Optimierung des Reinigungsverfahrens durch Klonierung eines Streptavidin-Tags *downstream* des *proA*-Gens erwies sich als nicht erfolgreich. Die Produktion von ProA-Strep ergab zwar keinen Unterschied zu ProA in *L. pneumophila* Corby WT, jedoch war die Aufreinigung mit einer Strep-Tactin Säule (Iba) nicht möglich (vergleiche Tabelle 5.1, Daten nicht gezeigt).

Die Proteaseaktivität des isolierten ProA wurde mittels Azocasein-Assay bestimmt (siehe Kapitel 4.8.2). Dazu wurde die Zink-Metalloprotease mit Azocasein inkubiert,

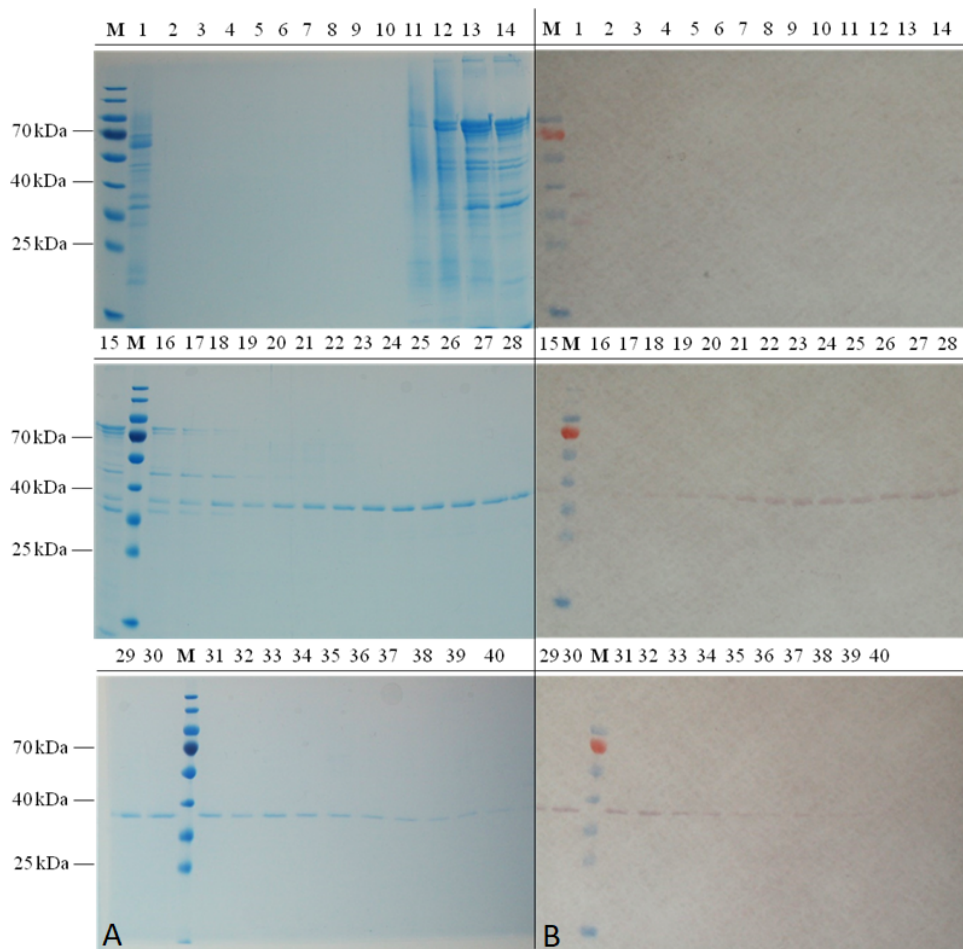


Abbildung 5.1: SDS-Gelanalyse der Reinigung von nativem ProA. Nach der Anionenaustauschchromatographie wurden die einzelnen Fraktionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Gele mit Coomassie Silver-Blue gefärbt (A) oder mittels Western Blot-Verfahren auf eine PVDF-Membran transferiert (B). Der Nachweis von nativem ProA erfolgte mit einem spezifischen anti-ProA Antikörper (PHK101-D5) und einem mit alkalischer Phosphatase gekoppelten Sekundärantikörper. Aufgetragen wurden je 20 µl der Proteinprobe (1), des Durchflusses (2), der Waschfraktionen (3-7) und der Elutionsfraktionen (8-40). Als Marker wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder von ThermoScientific verwendet.

die Proteine mit TCA gefällt und der abgespaltene Azofarbstoff im Überstand bei OD_{420} vermessen. Für die Analyse wurden unterschiedliche ProA-Konzentration zwischen 1,5 ng/mL und 48 µg/mL eingesetzt. Die Mittelwerte eines exemplarischen Experiments in Sechsfachbestimmung sind in Abbildung 5.2 dargestellt.

Ab einer Proteinkonzentration von 375 ng/mL ließ sich eine mit dieser Methode messbare Proteaseaktivität nachweisen. Die OD_{420} stieg dabei proportional mit der eingesetzten ProA-Konzentration an. Somit konnte die Aktivität der isolierten, nativen Zink-Metalloprotease bestätigt und Erkenntnisse über die einzusetzende Proteinkon-

5 Ergebnisse

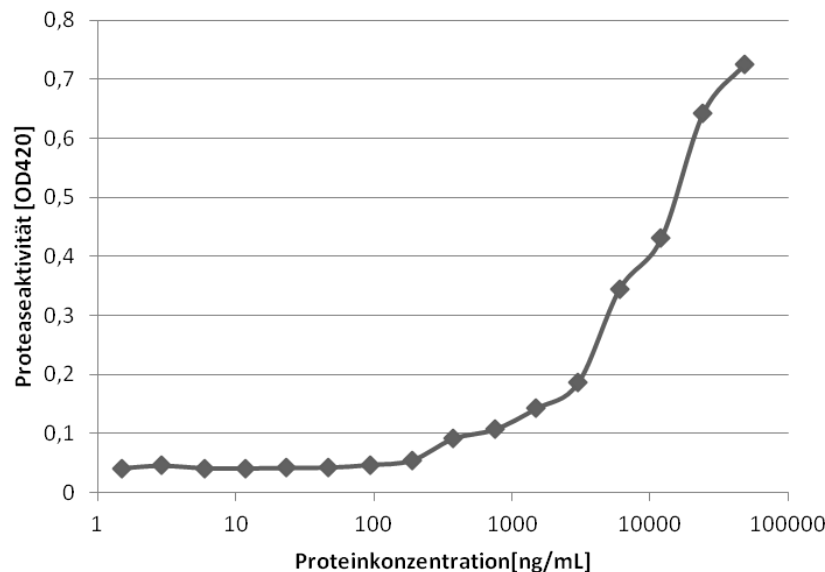


Abbildung 5.2: Bestimmung der konzentrationsabhängigen Proteaseaktivität von nativem ProA. Natives ProA wurde mittels Anionenaustauschchromatographie aus dem Überstand einer *L. pneumophila* Corby-Kultur isoliert. Die Proteinkonzentration des isolierten ProA wurde mit Hilfe des Bradford-Assays mit Roti®-Nanoquant bestimmt. Für die Bestimmung der Proteaseaktivität wurden ProA-Konzentrationen zwischen 1,5 ng/mL und 48 µg/mL eingesetzt. Die Aktivität der Protease wurde über die Abspaltung eines Azofarbstoffes von Casein und Bestimmung der optischen Dichte bei 420 nm ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte eines exemplarischen Experiments in Sechsfachbestimmung.

zentration in weiterführenden Untersuchungen gewonnen werden.

5.1.2 Produktion und Reinigung von rekombinantem ProA

Um ProA gezielter und in größeren Mengen zu produzieren und aufzuarbeiten, wurde die Protease rekombinant in *E. coli* produziert. Dafür wurden verschiedene Expressionssysteme und Produktionsbedingungen getestet, von denen sich jedoch ein Großteil als ungeeignet erwies (siehe Tabelle 5.1). Vielversprechend war die Produktion mit dem Expressionsplasmid pET22b(+) in *E. coli* BL21. Dazu wurde das *proA*-Gen mit den Primern *proA_fw* und *proA_rev* amplifiziert, mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *XhoI* geschnitten und in den Vektor pET22b(+) kloniert. Der Vektor enthielt einen C-terminalen, nicht abspaltbaren Hexahistidin-Tag. Nach der Ligation wurde das Konstrukt zunächst in *E. coli* DH10ß eingebracht und nach Reisolation in den Produktionsstamm *E. coli* BL21 (DE3). Nachfolgend werden die Ergebnisse der unterschiedlichen, verwendeten Reinigungsverfahren erläutert.

5.1.3 Affinitätschromatographie mit Protino® Ni-TED Tropfsäulen

Ein mittels Kolonie-PCR als positiv identifizierter Klon von BL21-pET22b(+)-*proA* wurde kultiviert, die Expression induziert und die Zellen geerntet. Der Kulturüberstand wurde sterilfiltriert und direkt für Affinitätschromatographie mit einer Protino® Ni-TED Tropfsäule eingesetzt. Aus dem Bakterienpellet wurde die periplasmatische Fraktion (PPF) isoliert und diese ebenfalls affinitätschromatographisch analysiert. Die Elution erfolgte mit 250 mM Imidazol. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht (Abb. 5.3).

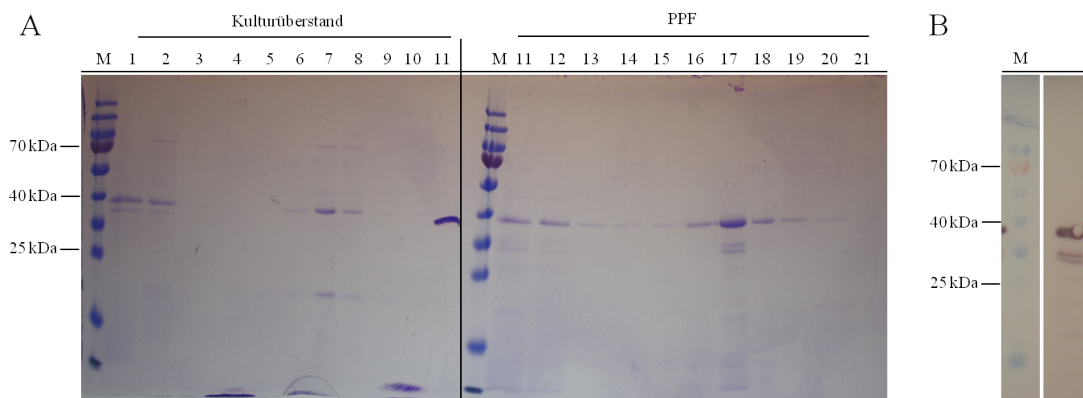


Abbildung 5.3: Reinigung von rekombinantem ProA mittels Protino® Ni-TED-Säule. Nach Induktion mit α -Lactose und Produktion über Nacht bei 30 °C wurde die *E. coli* BL21-pET22b(+)-*proA*-Kultur geerntet. Der sterilfiltrierte Kulturüberstand und die PPF wurden mittels Affinitätschromatographie über eine Protino® Ni-TED-Säule aufgereinigt. (A) Coomassie Silver-Blue gefärbte SDS-Gele nach der Affinitätschromatographie. Links: Aufreinigung des Kulturüberstandes, Durchfluss (1), Waschfraktionen (2-5), Elutionsfraktionen (6-11). Rechts: Aufreinigung der PPF, Durchfluss (11), Waschfraktionen (12-15), Elutionsfraktionen (16-21). Von jeder Fraktion wurden 20 μ L aufgetragen. Als Marker wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder von ThermoScientific verwendet. Es wurden 5 μ L des Markers aufgetragen. (B) Ausschnitt der Western Blot-Analyse von Fraktion 17. Der Nachweis von rekombinantem ProA erfolgte mit einem spezifischen anti-ProA Antikörper (PHK101-D5) und einem mit alkalischer Phosphatase gekoppelten Sekundärantikörper.

Auf dem SDS-Gel der Aufreinigung des Kulturüberstandes war im Durchfluss (1) bereits eine dominante Proteinbande knapp unterhalb der 40 kDa-Markerbande erkennbar. Die Analyse mit einem spezifischen anti-ProA-Antikörper bestätigte diese Bande als ProA. Auch in der ersten Waschfraktion (2) war diese Bande deutlich zu erkennen, was darauf hindeutet, dass ein Teil des rekombinanten ProA nicht an der Ni-TED-Säule gebunden hatte. In den Elutionsfraktionen 6-8 konnte ProA ebenfalls nachgewiesen werden. Zusätzlich waren hier jedoch noch weitere Proteinbanden bei ca. 20 kDa

5 Ergebnisse

und ca. 70 kDa zu sehen. Aus dem Kulturüberstand konnte mit dieser Methode somit kein reines ProA isoliert werden. Das SDS-Gel nach der Aufreinigung der PPF zeigte im Durchfluss (11) sowie in den Waschfraktionen (12-15) ebenfalls eine dominante Proteinbande bei knapp 40 kDa. Auch diese wurden mittels Western Blot als ProA identifiziert. Jedoch konnte die rekombinant produzierte Protease auch in allen Elutionsfraktionen (16-21) nachgewiesen werden. Die am stärksten ausgeprägte Proteinbande war dabei in Fraktion 17 zu beobachten. Jedoch zeigte das SDS-Gel unterhalb der ProA-Bande zwei weitere Proteinbanden in Höhe der 35 kDa-Markerbande. Der Nachweis mittels Western Blot konnte diese ebenfalls als ProA identifizieren, da der primäre Antikörper spezifisch für die Zink-Metalloprotease ist. Vermutlich handelt es sich um Abbauprodukte des Proteins. Somit konnte mit dieser Methode reines, rekombinantes ProA isoliert werden. Die Ausbeute lag bei ca. 800 µg reinem ProA aus 500 mL Kultur.

5.1.4 Affinitätschromatographie mit FPLC

Rekombinantes ProA konnte, wie in Kapitel 5.1.3 beschrieben, bereits mit Ni-TED-Säulen erfolgreich gereinigt werden. Da für die Kristallisation jedoch größere Mengen an reinem Protein benötigt werden, sollte die Aufreinigung auf einen größeren Maßstab angepasst werden. Die Optimierung der rekombinanten ProA-Produktion und Aufreinigung erfolgte im Rahmen einer Masterarbeit von Lina Scheithauer (2016) und in Kooperation mit Dr. Konrad Büssow aus der Abteilung für rekombinante Proteinexpression (RPEX) vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI). Für die Produktion von rekombinantem ProA wurden 2 L einer *E. coli* BL21-pET22b(+)-*proA*-Kultur kultiviert, die Expression induziert und die Zellen geerntet. Anschließend wurde die PPF isoliert und die erhaltene Proteinsuspension für die Affinitätschromatographie mittels FPLC eingesetzt. Mit einer 1 mL HisTrap™ HP-Säule wurde das rekombinante ProA über den Hexahistidin-Tag isoliert (Abb. 5.4).

Auf dem InstantBlue™-gefärbten SDS-Gel waren im Durchfluss (1) und in der Waschfraktion (2) sehr viele Proteinbanden nachzuweisen, jedoch konnte keine dominante Bande bei 38 kDa detektiert werden. Die spezifische Untersuchung auf ProA mittels Western Blot ergab, dass auch geringe Mengen ProA in beiden Fraktionen enthalten waren. In den Fraktionen 3-12 ist die Elution mit 20 mM Imidazol dargestellt. Dabei war in den Fraktionen 4-9, neben einer Vielzahl an Proteinbanden unterschiedlichen Molekulargewichts, eine dominante Bande knapp unterhalb der 25 kDa-Markerbande

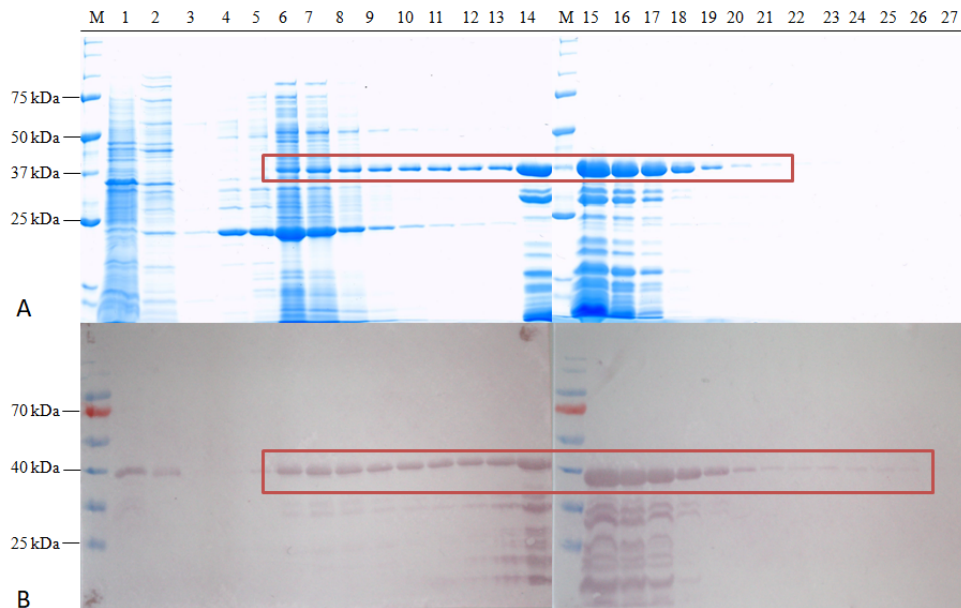


Abbildung 5.4: Reinigung von rekombinantem ProA über Affinitätschromatographie mittels FPLC. Nach Induktion mit α -Lactose und Produktion über Nacht bei 30 °C wurde die *E. coli* BL21-pET22b(+)-*proA*-Kultur geerntet. Die PPF wurde isoliert und über Affinitätschromatographie mittels FPLC aufgereinigt. Dafür wurde eine HisTrap™ HP-Säule verwendet. Von den Fraktionen wurden jeweils 15 μ L für die SDS-PAGE verwendet. Die Proteine wurden auf dem SDS-Gel mit Instant-Blue gefärbt (A) oder via Western Blot auf PVDF-Membranen transferiert (B). Der Nachweis von ProA erfolgte mit einem spezifischen anti-ProA Antikörper (PHK101-D5) und einem mit alkalischer Phosphatase gekoppelten Sekundärantikörper. Durchfluss (1), Waschfraktion (2), Elution mit 20 mM Imidazol (3-12), Elution mit 250 mM Imidazol (13-27). Als Marker wurden für das SDS-Gel 5 μ L des Precision Plus Protein Unstained Standards (Biorad) und für den Western Blot 5 μ L des Page-Ruler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). Die Fraktionen, die das 38 kDa-ProA enthalten, sind in rot markiert. Die Aufreinigung von rekombinantem ProA war erfolgreich, jedoch befanden sich auch viele Degradationsprodukte von ProA selbst in den markierten Fraktionen.

erkennbar. Die Analyse im Western Blot ergab jedoch, dass es sich hierbei nicht um Degradationsprodukte von ProA handelte. Die Protease konnte ebenfalls in diesen Fraktionen nachgewiesen werden. In den Fraktionen 14-17, nach Elution mit 250 mM Imidazol, konnte die größte Menge an ProA detektiert werden. Neben der 38 kDa-Bande waren auf dem SDS-Gel jedoch auch weitere Proteinbanden geringeren Molekulargewichts zu sehen. Der Nachweis mittels spezifischem anti-ProA Antikörper zeigte, dass es sich um Degradationsprodukte von ProA selbst handelte und nicht um Verunreinigungen durch andere Proteine.

5.1.5 Hydrophobe Interaktionschromatographie

In der Affinitätschromatographie konnte zwar reines, rekombinantes ProA isoliert werden, jedoch enthielten die Fraktionen auch eine Vielzahl an Degradationsprodukten der Protease. Im Zuge verschiedener Analysen im Anschluss an die IMAC wurde ursprünglich eine Gelfiltration mit den erhaltenen ProA-Fraktionen durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Dabei wurde eine auffällige Anreicherung eines weiteren, ca. 24 kDa großen Peptids beobachtet. Nach massenspektrometrischer Untersuchung stellte sich dieses als das ProA-Propeptid heraus. Dieses wurde zwar im Zuge der Autoaktivierung von der Protease abgespalten, jedoch ließ es sich, trotz des geringeren Molekulargewichts, nicht mehr über Gelfiltration abtrennen. Als eine alternative Methode wurde daher eine hydrophobe Interaktionschromatographie durchgeführt, wobei die Proteine nach ihrer Hydrophobizität aufgetrennt wurden. Dazu wurden die ProA-haltigen Fraktionen nach der Affinitätschromatographie vereinigt und auf eine Ammoniumsulfatkonzentration von 1 M eingestellt. Die Aufreinigung erfolgte mittels einer 1 mL HiTrap® Octyl FF-Säule. Für die Elution wurde die Salzkonzentration anschließend graduell verringert. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert (Abb. 5.5).

Sowohl auf dem InstantBlue™ gefärbten SDS-Gel als auch im Western Blot waren im Durchfluss (1) keine Proteinbanden zu erkennen, was darauf hindeutet, dass alle Proteine an die Säule gebunden hatten. Auch nach Waschen mit einem Hochsalzpuffer konnten keine Proteinbanden detektiert werden. Jedoch war die parallel gemessene Absorption der Waschfraktion bei 280 nm leicht erhöht (Daten nicht gezeigt), was zeigt, dass einige wenige ungebundene Proteine an dieser Stelle von der Säule entfernt wurden. In den Elutionsfraktionen (3-27) konnte ab Fraktion 7 eine dominante Proteinbande bei 38 kDa detektiert werden, die mittels Western Blot als ProA identifiziert werden konnte. ProA war bis Fraktion 26 nachweisbar, wobei die am stärksten ausgeprägten Proteinbanden auf dem SDS-Gel in den Fraktionen 14-20 zu sehen waren. Weiterhin konnten auch hier Degradationsfragmente in allen Fraktionen von ProA nachgewiesen werden (Abb. 5.5 A). In den Fraktionen 22-26 waren auf dem SDS-Gel außerdem zwei zusätzliche Proteinbanden zu erkennen, die sich im Western Blot jedoch nicht mit dem ProA-spezifischen Antikörper nachweisen ließen (Abb. 5.5 B). Möglicherweise handelte es sich hierbei um Verunreinigungen durch andere Proteine. Für die weitere Aufreinigung mittels Gelfiltration wurden daher nur die Fraktionen 7-21 eingesetzt.

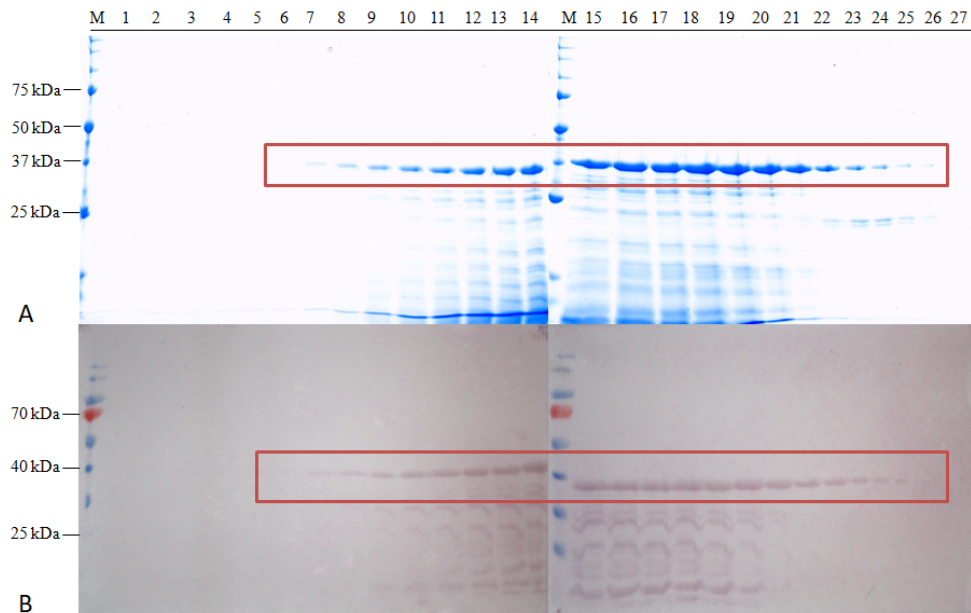


Abbildung 5.5: Reinigung von rekombinantem ProA mittels hydrophober Interaktionschromatographie. Nach Aufreinigung von rekombinantem ProA über Affinitätschromatographie wurden die reinen Fraktionen mit 1 M Ammoniumsulfat versetzt und über eine hydrophobe Interaktionschromatographie aufgereinigt. Dabei wurde eine HiTrap® Octyl FF-Säule eingesetzt. Von den Fraktionen wurden jeweils 15 µL für die SDS-PAGE verwendet. Die Färbung der Proteine auf dem SDS-Gel erfolgte mit InstantBlue™ (oben), der spezifische Nachweis von ProA mittels Western Blot und anti-ProA Antikörper (PHK101-D5) und alkalischer Phosphatase-Reaktion (unten). Aufgetragen wurden der Durchfluss (1), die Waschfraktion (2) und die Elutionsfraktionen (3-27). Eluiert wurde mit steigender Konzentration eines Niedrigsalz-Puffers. Als Marker wurden für das SDS-Gel 5 µL des Precision Plus Protein Unstained Standards (Biorad) und für den Western Blot 5 µL der Page-Ruler Prestained Protein Ladder (ThermoScientific) verwendet. Die ProA-haltigen Fraktionen sind in rot markiert. Mit dieser Methode wurden nahezu reine ProA-Fractionen gewonnen, die Degradationsprodukte jedoch nur geringfügig entfernt.

5.1.6 Gelpermeationschromatographie

Nach Durchführung der HIC konnten immer noch eine Vielzahl an Degradationsprodukten in den ProA-Fractionen nachgewiesen werden. Daher wurden diese vereinigt und für eine Gelpermeationschromatographie verwendet. Dafür wurde die Säule HiLoad® 16/600 Superdex 200 pg verwendet. In verschiedenen zuvor durchgeführten Testansätzen hatte sich herausgestellt, dass der Einsatz von EDTA für eine definiertere Elution von ProA von Vorteil war, weshalb dieses auch im Gelfiltrationspuffer enthalten war. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in der GC nach der Größe (Abb. 5.6).

5 Ergebnisse

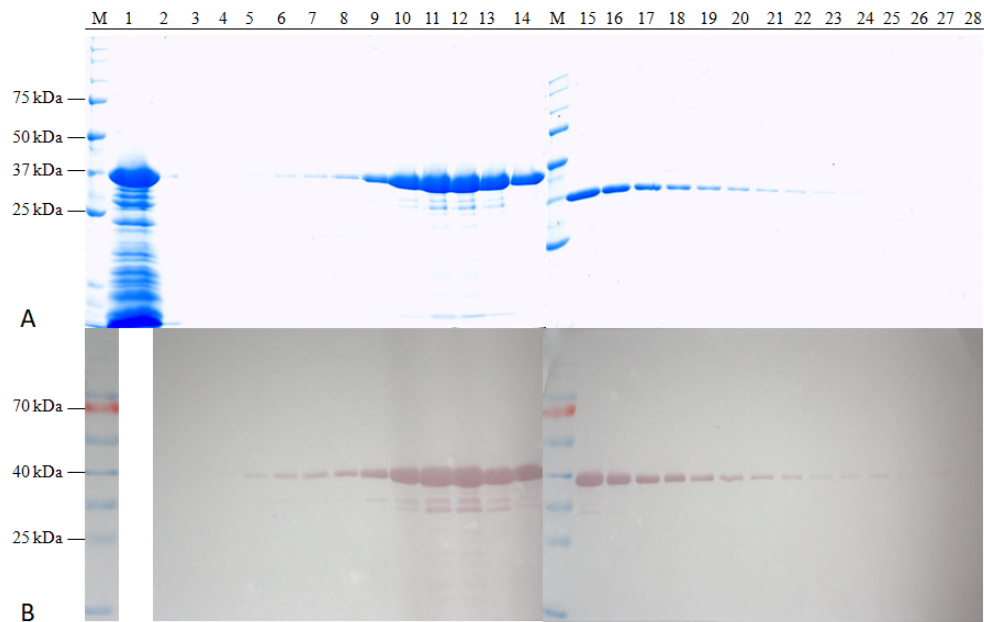


Abbildung 5.6: Reinigung von rekombinantem ProA mittels Gelpermeationschromatographie. Im Anschluss an die Aufreinigung von rekombinantem ProA über HIC wurde eine GPC durchgeführt und die Proteine mit einer HiLoad® 16/600 Superdex 200 pg nach ihrer Größe aufgetrennt. Von den erhaltenen Fraktionen wurden je 15 µL für die SDS-PAGE eingesetzt. Die Färbung der Proteinbanden auf dem SDS-Gel (oben) erfolgte mit InstantBlue™. Der spezifische Nachweis von ProA erfolgte mittels Western Blot (unten) unter Verwendung eines spezifischen anti-ProA Antikörpers (PHK101-D5) und eines mit alkalischer Phosphatase gekoppelten Sekundärantikörpers. Aufgetragen wurden die aufkonzentrierten HIC-Fractionen (1, im Western Blot nicht analysiert) und die Elutionsfraktionen (1-28). Als Marker (M) wurden jeweils 5 µL des Precision Plus Protein Unstained Standards (Biorad) oder der Page-Ruler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) verwendet. Mit Hilfe der GPC konnte ein Großteil der Degradationsprodukte entfernt und reines ProA gewonnen werden.

Auf dem InstantBlue™-gefärbten SDS-Gel wurden zusätzlich die konzentrierten HIC-Fractionen vor der GPC (1) aufgetragen. Gut erkennbar waren die dominante ProA-Bande bei 38 kDa und die Degradationsprodukte mit unterschiedlichen Molekulargewichten. Die Elution von ProA erfolgte ab Fraktion 6 und konnte bis Fraktion 23 nachgewiesen werden. In den Fraktionen 10-18 waren die höchsten Proteinmengen nachzuweisen. Im Vergleich zu der zuvor durchgeführten HIC war die Menge an niedermolekularen Degradationsprodukten deutlich reduziert (Abb. 5.6 A). Unterhalb der 38 kDa ProA-Bande konnten zwei weitere, schwach ausgeprägte Banden verzeichnet werden, die jedoch mittels spezifischem anti-ProA Antikörper als ProA-Degradationsprodukte identifiziert werden konnten (Abb. 5.6 B). Insgesamt konnte mit der GPC eine hohe Ausbeute an reinem, rekombinantem ProA erzielt werden. Nach Aufreinigung über IMAC, HIC und GPC konnten aus 2 L Kultur 3-5 mg Protein gewonnen werden.

5.1.7 Kristallisation von ProA

In Hinblick auf die Entschlüsselung der ProA-Struktur wurden erste Kristallisationsversuche im Rahmen der Masterarbeit von Lina Scheithauer (2016) in Kooperation mit Dr. Konrad Büssow aus der Abteilung für Rekombinante Proteinexpression (RPEX) vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung durchgeführt. Dafür wurden die ProA enthaltenden Elutionsfraktionen der GPC aufkonzentriert und teilweise in Tris-HCl, pH 7,5 umgepuffert, um Glycerin und EDTA zu entfernen. Die Kristallisation erfolgte nach der *Sitting-Drop*-Methode, wobei sich die hoch konzentrierte Proteinlösung in einem seitlichen Reservoir neben dem Fällungsmittel befindet. Um die optimale Kristallisationsbedingung auszuloten, wurden unterschiedliche Konzentrationen an ProA (4,9 mg/mL, 9,4 mg/mL und 21,2 mg/mL) eingesetzt. Weiterhin wurden verschiedene Kristallisationsscreening-Sets mit jeweils 96 unterschiedlichen Bedingungen verwendet (Index, MIDAS, Morpheus, ComPAS, Cryos, JCSG+, JCSG Core I, JCSG Core II, JCSG Core III, JCSG Core IV und PACT). Die Dokumentation der Kristallisationsplatten erfolgte nach 0 h, 12 h, 24 h, 3 d, 5 d, 8 d und anschließend in unregelmäßigen Abständen (Abb. 5.7).

Unter Verwendung des JCSG Core I-Sets konnte mit dem Fällungsmittel 0,2 M Calciumacetat, 0,2 M MES und 20 % (w/v) PEG 8.000 nach 65 d Inkubation ein großer Kristall detektiert werden (Abb. 5.7 A). Eingesetzt wurden hierbei 21,2 mg/mL ProA-His₆ in 20 mM Tris-HCl, pH 7,5. Der Kristall zeigte eine sehr unregelmäßige, heterogene Struktur, was ein typisches Merkmal für Proteinkristalle ist. Jedoch schien es sich aufgrund seiner Konformation nicht um einen sogenannten Einkristall zu handeln, wie er für eine Strukturaufklärung benötigt wird. Der Kristall leuchtete schwach unter kreuzpolarisiertem Licht, was erfahrungsgemäß eher gegen einen Proteinkristall sprechen würde. Zu früheren Zeitpunkten konnte kein Kristallkeim beobachtet werden, aus dem sich ein großer Kristall normalerweise bildet. Allerdings erfolgte zwischen den Beobachtungen an Tag 22 und Tag 65 auch keine Dokumentation. Nach 105 d war kein weiteres Wachstum des Kristalls zu verzeichnen.

Eine weitere vielversprechende Bedingung war die Fällung mit 0,1 M Tris, 40 % (v/v) PEG 300 und 5 % (w/v) PEG 1.000 aus dem JCSG Core III-Set (Abb. 5.7 B). Hierbei wurden 9,4 mg/mL ProA-His₆ in 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 % Glycerin und 1 mM EDTA eingesetzt. Zu beobachten waren sehr viele, kleine Kristalle mit heterogener Struktur, die unter kreuzpolarisiertem Licht nicht leuchteten. Eine erste Keimbildung konnte bereits nach 8 d verzeichnet werden (Daten nicht gezeigt). Die Größe der Kris-

5 Ergebnisse

tallite veränderte sich bereits nach 21 d nicht mehr und lag bei den größten Kristallisationskeimen bei ca. 17 μm .

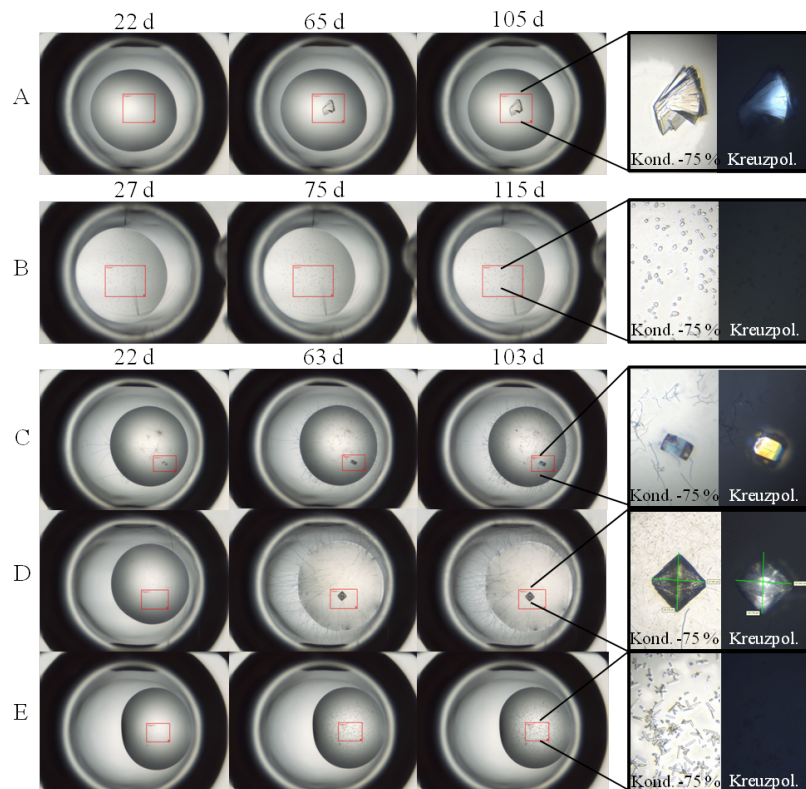


Abbildung 5.7: Kristallisation von rekombinantem ProA unter verschiedenen Bedingungen. (A) Kristallisationsansatz mit 21,2 mg/mL ProA-His₆ in 20 mM Tris-HCl, pH 7,5 nach 22 d, 65 d und 105 d (JCSG Core I, Qiagen). Eine Kristallbildung wurde nach 65 d mit 0,2 M Calcium-Acetat, 0,1 M MES und 20 % (w/v) PEG 8,0 beobachtet werden. (B) Ansatz mit 9,4 mg/mL ProA-His₆ in 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 % Glycerin und 1 mM EDTA nach 27 d, 75 d und 115 d (JSCG Core III, Qiagen). Kristallbildung wurde unter Fällung mit 0,1 M Tris, 40 % (v/v) PEG 300 und 5 % (w/v) PEG 1.000 detektiert. (C) Kristallisation von 4,9 mg/mL ProA-His₆ in 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,1 % Glycerin und 0,1 mM EDTA nach 22 d, 63 d und 103 d (PACT von Qiagen). Eine Kristallbildung wurde in 20 % (w/v) PEG 6.000, 0,1 M HEPES und 0,2 M CaCl₂ beobachtet. (D) Kristallisationsansatz mit 21,2 mg/mL ProA-His₆ in 20 mM Tris-HCl, pH 7,5 nach 22 d, 63 d und 103 d (PACT, Qiagen). Eine Kristallbildung konnte unter Fällung mit 0,1 M MES, 20 % (w/v) PEG 6.000 und 0,2 M MgCl₂ detektiert werden. (E) Ansatz mit 4,9 mg/mL ProA-His₆ in 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,1 % Glycerin und 0,1 mM EDTA nach 22 d, 63 d und 103 d (Cryos, Qiagen). Kristalle wurden unter Fällung mit 0,07 M Natriumacetat, pH 4,6, 30 % (v/v) Glycerin und 5,6 % (w/v) PEG 4.000 beobachtet.

Unter Verwendung des PACT-Sets von Qiagen konnte unter zwei verschiedenen Bedingungen eine Kristallbildung detektiert werden. Für die Fällung mit 20 % (w/v) PEG 6.000, 0,1 M HEPES und 0,1 M CaCl₂ wurden 4,9 mg/ mL ProA-His₆ in 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,1 % Glycerin und 0,1 mM EDTA verwendet (Abb. 5.7 C). Bereits nach 9 d konnte ein einzelner Kristallkeim beobachtet werden (Daten nicht gezeigt), der ein

Wachstum bis Tag 103 aufwies. Bis Tag 22 war der Einkristall klar, färbte sich danach jedoch etwas dunkler. Unter kreuzpolarisiertem Licht leuchtete der Kristall hell, jedoch auch einfarbig. Die Form des Kristalls war heterogen und kubisch. Der Ansatz zeigte weiterhin ein Wachstum von Pilzhypen, die auch den Kristall selbst betrafen. Eine Reproduktion der Bedingungen war daher nicht gegeben.

Weiterhin wurde unter Fällung mit 0,1 M MES, 20 % (w/v) PEG 6.000 und 0,2 M MgCl_2 eine Kristallbildung beobachtet (Abb. 5.7 D). Dafür wurden 21,2 mg/mL ProA-His₆ in 20 mM Tris-HCl, pH 7,5 eingesetzt. Nach 63 d Inkubation konnte ein großer, relativ homogen strukturierter Kristall detektiert werden, der unter kreuzpolarisiertem Licht stark leuchtete. Bis Tag 22 konnte keine Keimbildung beobachtet werden. Auch eine Kontamination durch einen Pilz wurde erst ab Tag 63 detektiert, weshalb die Kristallbildung vermutlich mit dieser im Zusammenhang steht. Die Größe des Kristalls lag nach 103 d bei ungefähr 130 μm .

Für die Kristallisation von ProA wurde des Weiteren das Cryos-Set von Qiagen getestet. Dafür wurden 4,9 mg/mL ProA-His₆ gelöst in 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,1 % Glycerin und 0,1 mM EDTA verwendet (Abb. 5.7 E). Eine Kristallbildung wurde unter Fällung mit 0,07 M Natriumacetat, pH 4,6, 30 % Glycerin und 5,6 % (w/v) PEG 4.000 beobachtet. Erste Kristallkeime waren nach 14 d zu sehen, die sich über die Zeit vergrößerten. Insgesamt handelte es sich um sehr kleine, nadelförmige Kristallite, die unter kreuzpolarisiertem Licht nicht leuchteten.

Die ersten Kristallisationen waren somit erfolgreich, da Kristallbildung unter verschiedenen Bedingungen beobachtet werden konnte. Besonders wichtig schien hierbei die Anwesenheit von PEG zu sein. Vielversprechend war insbesondere der Ansatz mit 0,1 M Tris, 40 % (v/v) PEG 300 und 5 % (w/v) PEG 1.000 aus dem JCSG Core III-Set (Abb. 5.7 B), da es sich hierbei mit höchster Wahrscheinlichkeit um Proteinkristalle handelte und die Kristallisationsbedingungen reproduzierbar sind. Diese Ergebnisse schufen somit eine gute Grundlage für eine erfolgreiche Kristallisation und Strukturaufklärung der Zink-Metalloprotease ProA.

5.2 Einfluss von ProA auf das Wachstumsverhalten und das Sekretom

Die Zink-Metalloprotease ProA ist das meist sezernierte Protein von *L. pneumophila* und in der Lage, mit anderen Proteinen des Sekretoms zu interagieren (Szeto and

5 Ergebnisse

Shuman, 1990, Rossier et al., 2004, Banerji et al., 2005, Lang et al., 2012). In diesem Teil der Arbeit sollte daher ein möglicher Einfluss von ProA auf das gesamte Sekretom von *L. pneumophila* untersucht werden. Dazu wurde zunächst eine Deletionsmutante der Protease erstellt und weiterhin ein potentieller Effekt auf das Wachstumsverhalten analysiert.

5.2.1 Erstellung einer *proA*-Deletionsmutante

Um einen möglichen Einfluss von ProA auf das Wachstumsverhalten und das Sekretom zu untersuchen sowie um weitere phänotypische Charakterisierungen durchzuführen, wurde eine Deletionsmutante der Protease in *L. pneumophila* Corby hergestellt (Abb. 5.8).

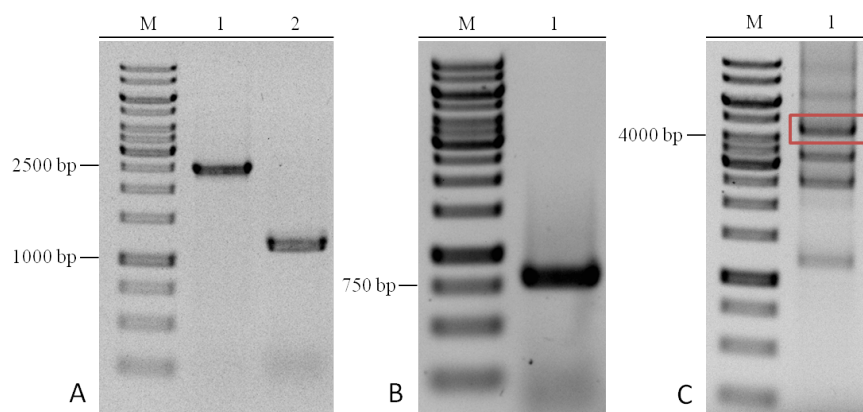


Abbildung 5.8: Agarosegele der *proA*-flankierenden Regionen, der Kanamycin-Kassette und des Deletionskonstrukts. (A) Amplifikation der 5′- und 3′-flankierenden Regionen des *proA*-Gens. Das Amplifikat der 5′-flankierenden Region (1) lag bei einer Größe von 2515 bp, die 3′-flankierende Region (2) bei 1188 bp. (B) Nachweis der *nptI*-Kanamycin-Kassette (1) mit einer Größe von 816 bp. (C) Erhaltene DNA-Banden nach der Joining-PCR. Das Deletionskonstrukt aus den *proA*-flankierenden Regionen und der Kanamycin-Resistenz-Kassette lag bei einer Gesamtgröße von 4471 bp (roter Kasten). Die entsprechende Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA isoliert. Dargestellt sind die 1 %-igen Agarosegele nach der Färbung mit Ethidiumbromid. Als Marker wurde die 1 kb GeneRuler® DNA-Ladder von ThermoScientific verwendet.

Mit Hilfe der Primer 2877_UFF und 2877_UFR wurde dafür zunächst die 5′-flankierende Region (2515 bp) und mit den Primern 2877_DFF und 2877_DFR die 3′-flankierende Region (1188 bp), jeweils mit einem zur Kanamycin-Kassette komplementären Überhang, amplifiziert (Abb. 5.8 A). Das *nptI*-Kanamycinresistenzgen (816 bp) wurde in einer separaten PCR mit den Primern NptI_Fa und NptI_R amplifiziert (Abb. 5.8 B). Die Erstellung des Deletionskonstrukts erfolgte durch eine Joining-PCR mit

den Primern 2877_UFF und 2877_DFR, bei der die flankierenden Regionen mit der Kanamycin-Kassette verbunden wurden (Abb. 5.8 C). Die Amplifikation der 5'- und 3'-flankierenden Regionen (Abb. 5.8 A) sowie der Kanamycin-Kassette (Abb. 5.8 B) war erfolgreich, da auf den 1 %-igen Agarosegelen jeweils einzelne Banden bei den entsprechenden, vorhergesagten Konstruktgrößen zu sehen waren. Das Gelbild der Joining-PCR (Abb. 5.8 C) zeigte dagegen mehrere DNA-Banden auf unterschiedlichen Höhen der Markerbanden. Dominant waren dabei Banden bei ca. 1200 bp, 2500 bp, 3400 bp und 4500 bp. Die ermittelte Größe des Deletionskonstrukts lag bei 4472 bp. Daher wurde die DNA-Bande bei ca. 4500 bp ausgeschnitten und aufgereinigt. Anschließend erfolgte die Ligation mit dem Vektor pGEM®-T Easy. Nach Transformation von kompetenten *E. coli* DH10 β wurde das Plasmid aus einem positiven Klon reisoliert und für die Amplifikation des gesamten Deletionskonstrukts mit den Primern 2877_UFF und 2877_DFR verwendet. Das Amplifikat wurde für die Transformation von *L. pneumophila* Corby verwendet. Durch die natürliche Kompetenz der Legionellen wurde das DNA-Konstrukt aufgenommen und die Zielsequenz im Genom durch homologe Rekombination ersetzt. Der erhaltene *proA*-Deletionsstamm wurde anschließend mittels Kolonie-PCR (Abb. 5.9) und Sequenzierung verifiziert.

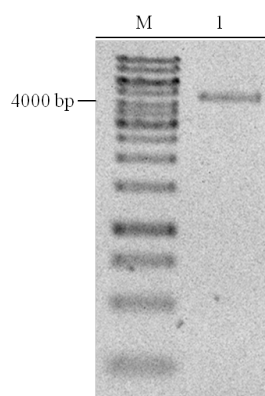


Abbildung 5.9: Agarosegelelektrophorese der Kolonie-PCR von *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$. Die Amplifikation der Zielsequenz aus dem Genom des Deletionsstammes ergab ein ca. 4500 bp großes Produkt (1). Dieses entsprach der Größe des Deletionskonstrukts mit 4472 bp. Dargestellt ist das 1 %-ige Agarosegel nach der Färbung mit Ethidiumbromid. Als Marker wurde die 1 kb GeneRuler® DNA-Ladder von ThermoScientific verwendet.

5.2.2 ProA hat keinen Einfluss auf das Wachstum in YEB

Um zu analysieren, ob die Deletion des *proA*-Gens möglicherweise zu einem Wachstumsnachteil in *L. pneumophila* Corby führt, wurden Wachstumsversuche in YEB-Medium durchgeführt. Dafür wurden zunächst Vorkulturen von *L. pneumophila* Corby WT und *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ angesetzt und diese unter Standardbedingungen ü.N. kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Hauptkulturen in 250 mL YEB mit einer OD_{600} von 0,03 inokuliert. Sofort im Anschluss wurde die OD_{600} bestimmt und jeweils 2 mL des Kulturüberstandes für die weitere Analyse entnommen. Die Kultivierung der Wachstumsreihen erfolgte jeweils in Doppelbestimmung bei 37 °C und 200 rpm. Die Messungen der optischen Dichte sowie die Isolierung des Kulturüberstandes erfolgten nach zufällig ausgewählten Zeitpunkten, jedoch möglichst in einem 2 h-Rhythmus (Abb. 5.10).

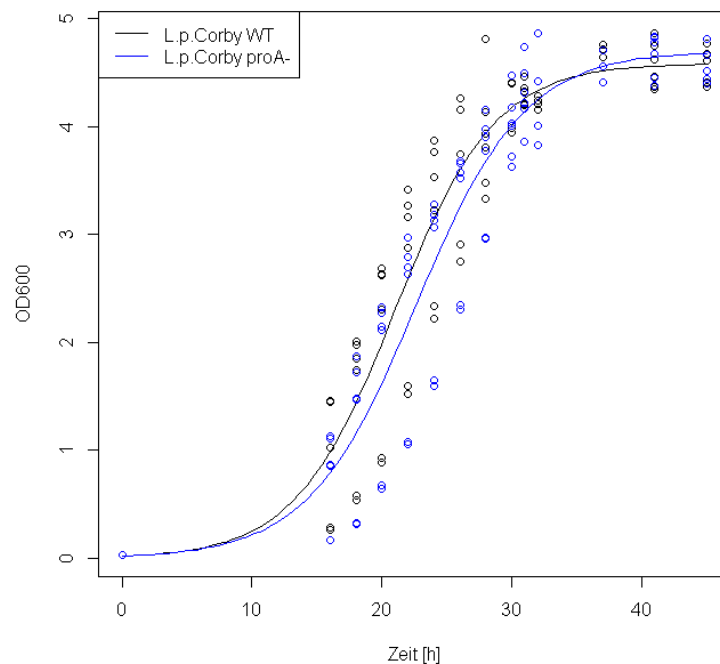


Abbildung 5.10: Wachstumsverhalten in YEB-Medium. Dargestellt ist die OD_{600} von *L. pneumophila* Corby WT (schwarz) und *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ (blau) in Relation zu der Zeit. Die Kulturen wurden jeweils in 250 mL YEB-Medium bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Die Messung der optischen Dichte erfolgte nach den ausgewiesenen Zeitpunkten. Die Ergebnisse sind aus drei unabhängigen Experimenten, jeweils in Doppelbestimmung, zusammengefasst. Beide Stämme zeigten keinen signifikanten Unterschied im Wachstumsverhalten.

Bis ca. 12 h nach Inokulierung der Kulturen war nur ein geringer Anstieg der OD₆₀₀ sowohl für *L. pneumophila* Corby WT als auch für *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ zu verzeichnen. Ab ungefähr 13 h nach dem Inkubationsstart begann die exponentielle Wachstumsphase beider Stämme. So konnte nach 16 h Inkubation für den Wildtyp und die *proA*-defiziente Mutante eine OD₆₀₀ von ca. 1,0 detektiert werden. Nach 25 h lag die mittlere OD₆₀₀ für *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ bei ungefähr 3,0. Die OD₆₀₀ von *L. pneumophila* Corby WT war dabei mit 3,3 etwas höher. Das Ende der log-Phase zeichnete sich ungefähr 30 h nach der Inokulierung ab. Hier lagen die mittleren OD₆₀₀ von Wildtyp und *proA*-negativer Mutante bei ca. 4,0. Somit hatte sich die OD₆₀₀ nach 14 h ungefähr vervierfacht. In der frühen Stationärphase flachte der Kurvenverlauf ab. So konnten nach 36 h und 44 h ähnliche OD₆₀₀ von ungefähr 4,5 für beide Stämme detektiert werden. Insgesamt verlief das Wachstum der *proA*-defizienten Mutante leicht verzögert im Vergleich zum Wildtyp, da der Eintritt in die log-, bzw. Stationärphase etwas später erfolgte. Jedoch waren diese Unterschiede minimal und nicht signifikant. Parallel zur OD₆₀₀ wurden die Proteinkonzentrationen und die Proteaseaktivität beider Stämme in den einzelnen Wachstumsphasen bestimmt. Dafür wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten Kulturüberstände entnommen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Bradford-Assay mit Roti[®]-Nanoquant. Die Proteaseaktivität wurde mit Hilfe eines Azocasein-Assays untersucht. Die gemessene Absorption bei 420 nm als Maß für die Substratumsetzung war dabei proportional zur Proteaseaktivität im Sekretom (Abb. 5.11).

Die Proteinkonzentrationen von *L. pneumophila* Corby WT und *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ waren für alle Wachstumsphasen ähnlich ((Abb. 5.11 A). Dabei war schon zu Beginn des Wachstumsversuches eine Proteinkonzentration von ungefähr 10 µg/mL bei beiden Stämmen zu verzeichnen, was sich vermutlich auf die im Kulturmedium enthaltenen Proteine zurückführen lässt. Bei beiden Stämmen stiegen die Proteinkonzentrationen parallel zur OD₆₀₀ vergleichbar an. So betrug die Proteinkonzentration bei einer OD₆₀₀ von 2,0 beim Wildtyp ca. 15 µg/mL, bei der *proA*-defizienten Mutante ca. 16 µg/mL. In der Stationärphase bei OD₆₀₀ von 4,0 wies der Kulturüberstand von *L. pneumophila* Corby WT eine Proteinkonzentration von ungefähr 25 µg/mL auf, der Kulturüberstand von *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ von ungefähr 24 µg/mL. Somit konnten keine signifikanten Unterschiede in der Proteinkonzentration zwischen dem Kulturüberstand des Wildtyps und dem der *proA*-negativen Mutante nachgewiesen werden.

5 Ergebnisse

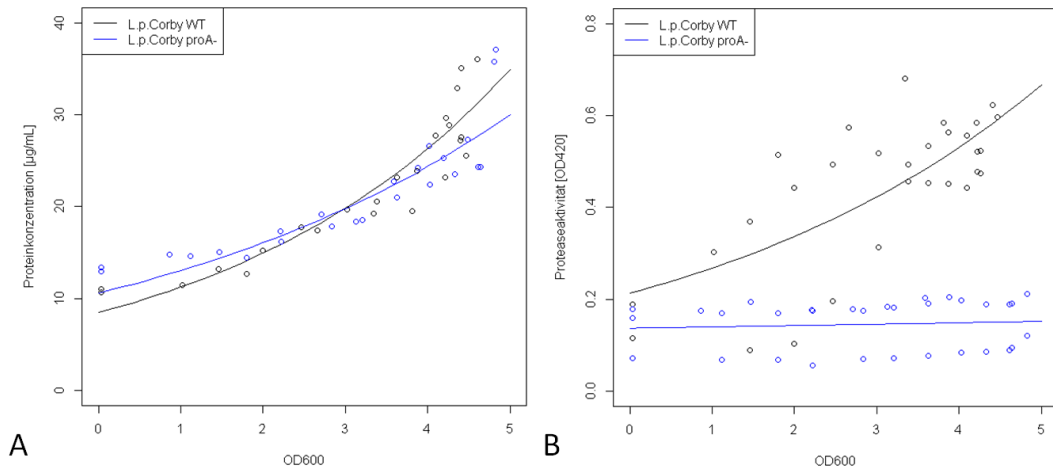


Abbildung 5.11: Proteinkonzentration und Proteaseaktivität von *L. pneumophila*-YEB-Kulturüberständen. Während des Wachstumsversuches wurden Kulturüberstände von *L. pneumophila* Corby WT (schwarz) und *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ (blau) zu den entsprechenden Zeitpunkten entnommen. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford-Assay mit Roti[®]-Nanoquant und die Proteaseaktivität mit Azocasein bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung. (A) Auftrag der Proteinkonzentration in µg/mL in Bezug auf die OD₆₀₀. Zwischen dem Wildtyp und der *proA*-negativen Mutante waren keine signifikanten Unterschiede zu erkennen. (B) Darstellung der Proteaseaktivität in OD₄₂₀ in Bezug auf die OD₆₀₀. Für den Wildtyp war ein Anstieg der Proteaseaktivität in Relation zum Anstieg der OD₆₀₀ zu verzeichnen. Die Proteaseaktivität der *proA*-defizienten Mutante blieb dagegen nahezu gleich und fiel deutlich geringer als beim Wildtyp aus.

Dagegen konnten deutliche Unterschiede in der Proteaseaktivität beider Stämme gezeigt werden (Abb. 5.11 B). Im Kulturüberstand des Wildtyps wurde ein Anstieg der mittleren Proteaseaktivität parallel zum Anstieg der OD₆₀₀ verzeichnet. Bei einer OD₆₀₀ von 1,0 lag die Proteaseaktivität bei ca. OD₄₂₀ 0,3. In der Stationärphase bei OD₆₀₀ 4,0 war die Aktivität auf ungefähr OD₄₂₀ 0,55 gestiegen und hatte sich somit nahezu verdoppelt. Die Untersuchung des Kulturüberstandes von *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ zeigte jedoch gegenteilige Ergebnisse. Die OD₄₂₀ blieb über sämtliche Wachstumsphasen bei ca. 0,15. Somit konnte für die *proA*-negative Mutante insgesamt nur eine minimale Proteaseaktivität im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden. Daher scheint ProA hauptverantwortlich für die Proteaseaktivität bei Wachstum von *L. pneumophila* in nährstoffreichem Medium zu sein.

5.2.3 ProA hat einen Einfluss auf das Wachstum in CDM

In nährstoffreichem YEB-Medium konnte für ProA kein Einfluss auf das Wachstumsverhalten von *L. pneumophila* festgestellt werden. Jedoch scheint es unter diesen Bedingungen hauptverantwortlich für die Proteaseaktivität zu sein. Um einen möglichen Einfluss von ProA auf das Wachstumsverhalten in nährstoffarmem, chemisch-definiertem Medium zu überprüfen, wurden zunächst Vorkulturen von *L. pneumophila* Corby WT und *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ in CDM angesetzt und unter Standardbedingungen inkubiert. Die Hauptkulturen wurden in 250 mL CDM in 500 mL Erlenmeyerkolben mit einer Start-OD₆₀₀ von ca. 0,01 inokuliert. Sofort im Anschluss wurde die OD₆₀₀ bestimmt und jeweils 2 mL des Kulturüberstandes für die weitere Analyse entnommen. Die Kultivierung der Wachstumsreihen erfolgte jeweils in Doppelbestimmung bei 37 °C und 200 rpm. Die Messungen der optischen Dichte sowie die Isolierung des Kulturüberstandes erfolgten nach zufällig ausgewählten Zeitpunkten, jedoch möglichst in einem 4 h-Rhythmus (Abb. 5.12). Die Versuche wurden im Rahmen einer Masterarbeit von Lina Scheithauer (2016) durchgeführt.

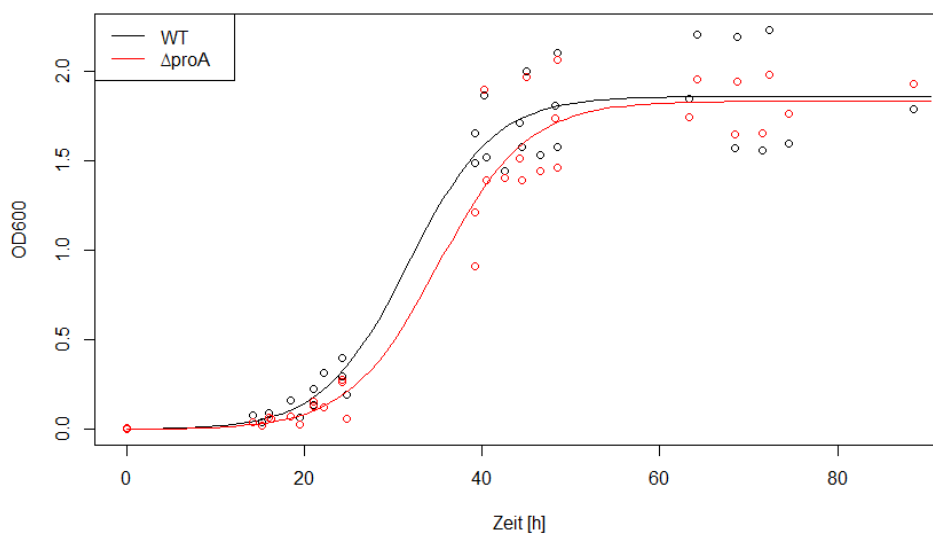


Abbildung 5.12: Wachstumsverhalten in chemisch-definiertem Medium. Dargestellt ist die OD₆₀₀ von *L. pneumophila* Corby WT (schwarz) und *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ (rot) in Relation zu der Zeit. Die Kulturen wurden in Doppelbestimmung in jeweils 250 mL CDM bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Die Messung der optischen Dichte erfolgte an den ausgewiesenen Zeitpunkten. Die Ergebnisse sind aus vier unabhängigen Experimenten zusammengefasst. Die *proA*-defiziente Mutante zeigte ein leicht verzögertes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp.

5 Ergebnisse

Bis ca. 23 h nach Inokulierung war für beide Stämme nur eine geringe Steigerung der OD₆₀₀ zu verzeichnen. So lag die durchschnittliche OD₆₀₀ von *L. pneumophila* Corby WT nach 23 h bei ca. 0,3, bei *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ sogar nur bei 0,2. Somit war das Wachstum der *proA*-negativen Mutante in der lag-Phase leicht verzögert im Vergleich zum Wildtyp. Die log-Phase verlief beim Wildtyp bis zu einer durchschnittlichen OD₆₀₀ von ca. 1,5, welche nach 42 h Wachstum erreicht wurde. Bei der *proA*-defizienten Mutante wurde das Ende der log-Phase mit gleicher OD₆₀₀ nach ungefähr 46 h detektiert. Somit führte die verlängerte lag-Phase von *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ auch zu einem verzögerten Eintritt in die Stationärphase. Nach der Verzögerungsphase erreichte *L. pneumophila* Corby WT die Stationärphase mit einer durchschnittlichen OD₆₀₀ von 1,8 ca. 50 h nach Inokulierung. Die OD₆₀₀ der *proA*-negativen Mutante lag in der Stationärphase in einem ähnlichen Bereich, jedoch wurde diese erst nach ca. 55 h erreicht. Zusammenfassend ergab dieser Versuch ein leicht verzögertes Wachstum für *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$.

Parallel zur OD₆₀₀ wurden die Proteinkonzentrationen und die Proteaseaktivität der zu den entsprechenden Zeitpunkten entnommenen Kulturüberstände bestimmt (Abb. 5.13). Die Ermittlung der Proteinkonzentration erfolgte via Bradford-Assay mit Roti®-Nanoquant. Für die Bestimmung der Proteaseaktivität wurde der Azocasein-Assay eingesetzt. Die Ergebnisse aus vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten sind in Abbildung 5.13 dargestellt. Die Proteinkonzentration, bzw. die Proteaseaktivität wurden dabei auf die gemessene OD₆₀₀ bezogen. Die bestimmten Proteinkonzentrationen (Abb. 5.13 A) fielen für *L. pneumophila* Corby WT und *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ in allen Wachstumsphasen ähnlich aus. Bei einer Start-OD₆₀₀ von 0,1 lagen die durchschnittlichen Proteinkonzentrationen für beide Stämme bei ca. 11 µg/mL. Mit Zunahme der OD₆₀₀ erhöhte sich auch jeweils die im Kulturüberstand detektierte Proteinkonzentration. Bei OD₆₀₀ 0,5, also dem Beginn der log-Phase, betrug die Proteinkonzentration für den Wildtyp und die *proA*-defiziente Mutante ca. 15 µg/mL. Am Ende der exponentiellen Wachstumsphase, bei OD₆₀₀ 1,5, lag sie für beide Stämme bei ungefähr 34 µg/mL. In der Stationärphase bei OD₆₀₀ 1,8 erhöhte sich die Proteinkonzentration von *L. pneumophila* Corby WT und *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ auf ca. 45 µg/mL. Somit ergab sich eine Zunahme der Gesamtkonzentration bis zur Stationärphase um 30 µg/mL. Ein Unterschied zwischen der *proA*-defizienten Mutante und dem Wildtyp konnten jedoch nicht festgestellt werden. Weiterhin wurde der Einfluss von ProA auf die Proteaseaktivität bei Wachstum in CDM analysiert (Abb. 5.13 B).

Die gemessene Absorption bei 420 nm als Maß für die Substratumsetzung war dabei proportional zur Proteaseaktivität im Sekretom.

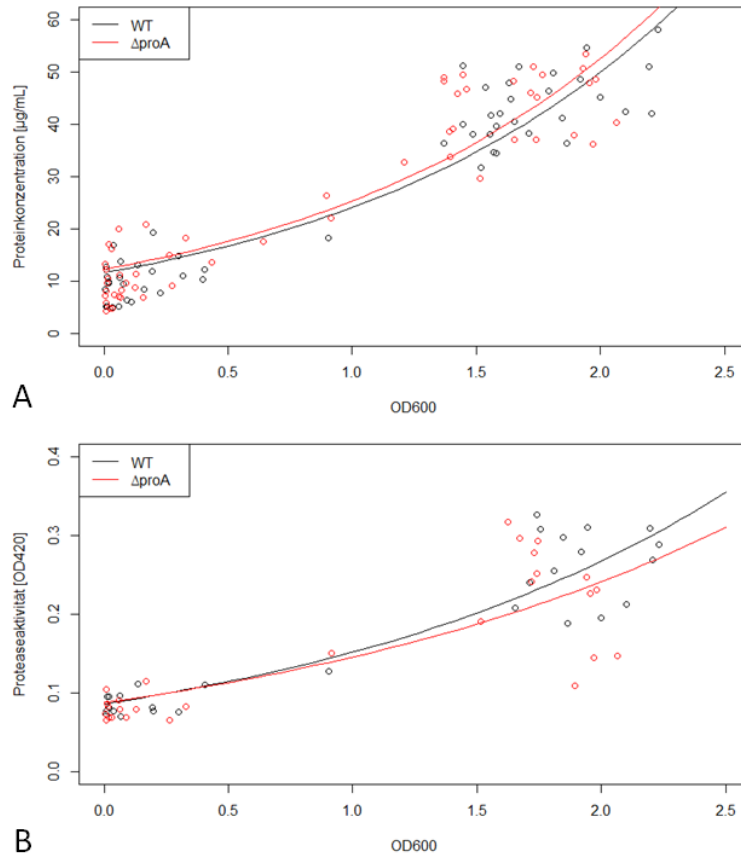


Abbildung 5.13: Proteinkonzentration und Proteaseaktivität von *L. pneumophila*-CDM-Kulturüberständen. Während des Wachstumsversuches in CDM wurden Kulturüberstände von *L. pneumophila* Corby WT (schwarz) und *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ (rot) zu den entsprechenden Zeitpunkten entnommen. Mittels Bradford-Assay mit Roti®-Nanoquant wurde die Proteinkonzentration und mit Azocasein die Proteaseaktivität bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse aus vier unabhängigen Experimenten. (A) Auftragung der Proteinkonzentration [$\mu\text{g/mL}$] in Bezug auf die gemessene OD₆₀₀. Beide Stämme zeigten eine ähnliche Proteinkonzentration in gleichen Wachstumsphasen. (B) Darstellung der Proteaseaktivität in OD₄₂₀ in Relation auf die OD₆₀₀. Es waren keine Unterschiede zwischen *L. pneumophila* Corby WT und *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ zu beobachten.

Auch hier fielen die ermittelten Aktivitäten von beiden Stämmen ähnlich aus. Zu Beginn des Wachstumsversuches bei OD₆₀₀ von 0,1 lag die durchschnittliche OD₄₂₀ für *L. pneumophila* Corby WT und *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ bei ca. 0,08. Zu Beginn der log-Phase bei OD₆₀₀ von 0,5 erhöhte sich die durchschnittliche Proteaseaktivität auf OD₄₂₀ 0,1. Jedoch war auch hier keine Differenz zwischen Wildtyp und *proA*-negativer Mutante zu beobachten. Bei dem Übergang in die Stationärphase, bei einer OD₆₀₀ von 1,5, lag die durchschnittliche OD₄₂₀ für *L. pneumophila* Corby WT

5 Ergebnisse

bei 0,2 und bei *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ bei ca. 0,18. Die Proteaseaktivität der *proA*-negativen Mutante fiel also in dieser Wachstumsphase etwas geringer aus als die des Wildtyps. In der stationären Phase bei OD₆₀₀ 1,8 konnte bei *L. pneumophila* Corby WT eine OD₄₂₀ von ungefähr 0,24 detektiert werden. Bei *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ lag die OD₄₂₀ in dieser Wachstumsphase bei ca. 0,2. Somit war auch hier eine leichte Differenz feststellbar. Die Proteaseaktivität erhöhte sich ab Beginn des Wachstumsversuches bis zur Stationärphase um OD₄₂₀ 0,16 für den Wildtyp und um OD₄₂₀ 0,12 für die *proA*-defiziente Mutante. *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ wies also im Vergleich zu *L. pneumophila* Corby WT eine leicht reduzierte Proteaseaktivität bei Wachstum in CDM auf, jedoch waren diese Differenzen nicht signifikant. Im Gegensatz zum Wachstum in YEB konnte bei diesem Versuch festgestellt werden, dass die *proA*-negative Mutante in CDM eine ähnliche Proteaseaktivität wie der Wildtyp aufwies.

5.2.4 ProA beeinflusst das Sekretomprofil in YEB

In Wachstumsversuchen in nährstoffreichem YEB-Medium konnte für *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ zwar kein Wachstumsdefizit im Vergleich mit *L. pneumophila* Corby WT detektiert werden, jedoch wurde deutlich, dass ProA hauptverantwortlich für die Proteaseaktivität von *L. pneumophila* in YEB ist. Um zu analysieren, ob der Verlust des meist-sezernierten Proteins sich auf das Sekretomprofil auswirkt, wurden zunächst die Proteine des Kulturüberstandes isoliert. Dafür wurden 50 mL-Kulturen von *L. pneumophila* Corby WT und *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ in YEB-Medium angesetzt und der Kulturüberstand nach Erreichen der Stationärphase entnommen und sterilfiltriert. Die enthaltenen Proteine wurden ü.N. mit TCA gefällt und nach mehrmaligem Waschen in einem geringen Volumen Rehydratisierungspuffer gelöst. Die Proteinkonzentrationen wurden mittels Bradford-Assay mit Roti®-Nanoquant bestimmt und pro Stamm 20 µg Protein für eine SDS-PAGE eingesetzt, da die Proteinkonzentration in beiden Stämmen in allen Wachstumsphasen gleich war (siehe Kapitel 5.2.2). Das SDS-Gel wurde mit Coomassie Silver-Blue gefärbt und das Sekretomprofil von Wildtyp und *proA*-negativer Mutante miteinander verglichen (Abb. 5.14).

Besonders auffällig war die markante Proteinbande in Höhe der 37 kDa-Markerbande im Wildtyp-Sekretom (Abb. 5.14 a). Diese war im Sekretom der *proA*-negativen Mutante nicht zu erkennen. Aufgrund des Molekulargewichts und der Dominanz im Sekretom konnte davon ausgegangen werden, dass es sich dabei um ProA handelte.

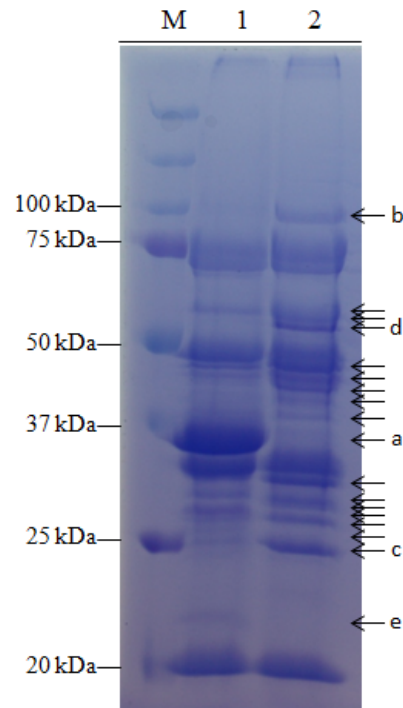


Abbildung 5.14: SDS-PAGE der Sekretome des Wildtyps und der *proA*-defizienten Mutante in YEB. Die sezernierten Proteine wurden mittels TCA-Fällung aus den Überständen stationärer Kulturen von *L. pneumophila* Corby WT und *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ isoliert. Mittels SDS-PAGE wurden die Sekretome aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie Silver-Blue gefärbt. Es wurden jeweils 20 μ g Protein pro Stamm aufgetragen, als Marker (M) wurde der Precision Plus Protein™ Dual Color Standard von Bio-Rad verwendet. (1) Sekretom des Wildtyps, (2) Sekretom der *proA*-negativen Mutante. Die schwarzen Pfeile markieren die detektierten, visuellen Unterschiede in den Sekretomprofilen. Die mit a-e gekennzeichneten Pfeile heben im Text näher erläuterte, unterschiedliche Proteinbanden hervor.

Zusätzlich zu dieser Proteinbande konnten jedoch auch weitere Unterschiede im Sekretom festgestellt werden. So schienen einige Proteine vermehrt im Sekretom von *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ vorzukommen, wie z.B. bei 100 kDa und 25 kDa (Abb. 5.14 b und c). Andere Proteinbanden konnten nur bei der *proA*-negativen Mutante detektiert werden, wie z.B. bei einem Protein knapp über der 50 kDa-Markerbande (Abb. 5.14 d). Jedoch konnten auch Banden beobachtet werden, die nur beim Wildtyp nachgewiesen werden konnten, wie eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 22 kDa (Abb. 5.14 e). Insgesamt ergab der Vergleich der Sekretome von *L. pneumophila* Corby WT und *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ in der eindimensionalen SDS-PAGE gravierende Unterschiede im Bandenprofil der *proA*-negativen Mutante. Um diese Unterschiede genauer zu detektieren wurde eine 2D-Gelelektrophorese durchgeführt (Abb. 5.15). Dafür wurden die Proteine der Kulturüberstände nach der TCA-

5 Ergebnisse

Fällung in CHAPS-freiem Rehydratisierungspuffer gelöst. Die 2D-Gelelektrophorese wurde von der Firma Proteome Factory AG aus Berlin durchgeführt. Für den 1:1-Vergleich wurden jeweils 200 µg Protein pro Stamm eingesetzt.

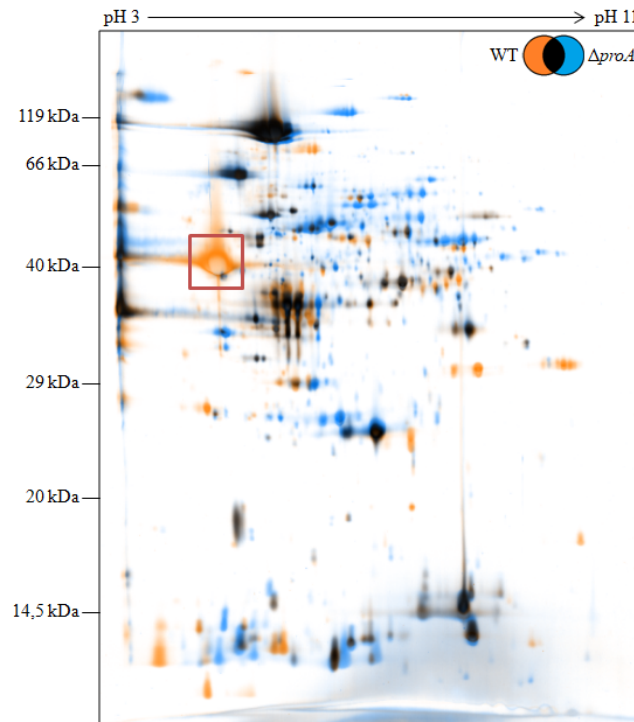


Abbildung 5.15: 2D-Gelelektrophorese der Sekretome von *L. pneumophila* Corby WT und *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ in YEB. Die sezernierten Proteine wurden mittels TCA-Fällung aus den Überständen stationärer Kulturen von *L. pneumophila* Corby WT und *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ isoliert. Mittels 2D-Gelelektrophorese wurden die Sekretome nach der isoelektrischen Fokussierung und dem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Proteine wurden mit Silberfärbung kenntlich gemacht und sind in diesem Foto in Fehlfarbandarstellung dokumentiert. Es wurden jeweils 200 µg Protein des Wildtyps (orange) und der *proA*-defizienten Mutante (blau) aufgetragen. Identische Proteinspots wurden in schwarz dargestellt. Die 2D-Gelelektrophorese ergab gravierende Unterschiede im Sekretomprofil bei den Stämmen. Der rote Kasten markiert den Proteinspot von ProA.

Auch hier konnten deutliche Unterschiede in den Sekretomprofilen von *L. pneumophila* Corby WT und *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ detektiert werden. Bei beiden Stämmen war ein dominanter Proteinspot in Höhe der 119 kDa-Markerbande und einem pH von ungefähr 5,0 zu beobachten. Auch bei pH 4,5 war knapp unterhalb der 66 kDa-Markerbande ein deutlicher Proteinspot zu erkennen, der sowohl bei *L. pneumophila* Corby WT als auch bei *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ präsent war. Weiterhin waren noch viele kleinere, identische Proteinspots zwischen 25 kDa und 60 kDa zu verzeichnen. Auch in Höhe der 14,5 kDa-Markerbande konnten identische Spots beobachtet

werden. Ein besonders dominanter Proteinspot, der nur im Sekretom des Wildtyps detektiert werden konnte, lag bei ca. 40 kDa und einem pH-Wert von 4,5. Molekulargewicht, isoelektrischer Punkt und das Fehlen im Kulturüberstand der *proA*-defizienten Mutante ließen darauf schließen, dass es sich hierbei um ProA handelte. Weitere, kleinere Proteinspots, die nur im Sekretom des Wildtyps nachgewiesen werden konnten, wurden bei sämtlichen Molekulargewichten detektiert. Dabei waren einige Proteinspots bei gleichem Molekulargewicht, jedoch unterschiedlichem isoelektrischem Punkt präsent. Vermutlich handelte es sich hierbei jeweils um das gleiche Protein. Auch für die *proA*-negative Mutante konnten eine Vielzahl an Proteinspots detektiert werden, die nicht im Sekretom des Wildtyps nachgewiesen werden konnten. Viele Protein befanden sich dabei im Bereich zwischen 25 kDa und >119 kDa sowie pH Werten zwischen 4,5 und 9,0. Weiterhin waren einige Proteinspots bei <14,5 kDa und pH-Werten zwischen 4,5 und 7,0 nur für *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ nachweisbar. Insgesamt zeigten die Ergebnisse, dass sich das Sekretom der *proA*-defizienten Mutante deutlich von dem des Wildtyps unterscheidet.

5.2.5 Im Sekretom der *proA*-Deletionsmutante sind zahlreiche Proteine dezimiert

Mittels SDS-PAGE und 2D-Gelelektrophorese konnten visuell bereits deutliche Unterschiede im Sekretom von *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ im Vergleich zu *L. pneumophila* Corby WT nachgewiesen werden. Um zu untersuchen, welche Proteine eventuell vermehrt oder verringert im Sekretom der *proA*-Deletionsmutante vorkommen, wurden die Sekretome massenspektrometrisch untersucht. Dafür wurden TCA-gefällte Überstände von stationären *L. pneumophila*-Kulturen aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten eingesetzt. Die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen fand in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe "Mikrobielle Proteomik" von Prof. Dr. Susanne Engelmann vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung statt. Die Sekretomproben wurden für die Analyse nach einer SDS-PAGE in definierten Teilstücken aus den Gelen ausgeschnitten und die Proteine tryptisch verdaut. Nach Extraktion aus den Gelstücken wurden die Proben via Zip Tips entsalzt und aufkonzentriert. Die massenspektrometrische Analyse erfolgte unter Verantwortung von Dr. Martin Kucklick mittels Orbitrap. Insgesamt konnte eine Vielzahl an Proteinen identifiziert werden, die verringert im Sekretom der *proA*-negativen Mutante vorkamen. Weiterhin waren einige Proteine, die im Wildtyp-Sekretom nachgewiesen werden konnten, bei *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ nicht detektierbar. In Tabel-

5 Ergebnisse

le 5.2 sind die im Vergleich zum Wildtyp-Sekretom signifikant verringerten Proteine des *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ -Sekretoms, geordnet nach ihrem Vorkommensverhältnis ($\Delta proA/WT$), dargestellt.

Tabelle 5.2: Im Sekretom der *proA*-Deletionsmutante signifikant dezimierte Proteine

GI-Nr.	Identität	Locus ¹	SigP ²	PSORT ³	Log2 ($\Delta proA/WT$)
148280472	Major acid phosphatase	LpC_0577	+	EC	-10,60
148282905	Tyrosine phosphatase II superfamily protein	LpC_3106	+	EC	-10,01
148282322	Hypothetical protein	LpC_2491	+	Unb.	-8,44
148280453	Phosphodiesterase	LpC_0557	-	Unb.	-7,39
148281537	TPR repeat protein	LpC_1689	+	Unb.	-6,74
166201731	GroEL protein	LpC_2606	-	CP	-6,71
148281265	Hypothetical protein	LpC_1401	+	Unb.	-6,42
189036673	Elongation factor Tu	LpC_3015	-	Unb.	-6,40
148282371	PseA-like protein	LpC_2544	-	Unb.	-6,28
259710089	Cytosol aminopeptidase	LpC_0510	-	CP	-6,16
148282356	Hypothetical protein	LpC_2529	+	Unb.	-6,11
166201610	Elongation factor G	LpC_3017	-	CP	-5,95
148281612	Aspartate semialdehyde dehydrogenase	LpC_1767	-	CP	-5,91
148281037	Hypothetical protein	LpC_1160	-	CM	-5,76
148280070	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	LpC_0159	-	CP	-5,63
166221556	Aminomethyltransferase	LpC_0138	-	CP	-5,49
148280808	Dihydrolipoamide dehydrogenase	LpC_0921	-	CP	-5,2
148281788	Hypothetical protein	LpC_1946	-	Unb.	-4,99
148282894	Aminopeptidase N	LpC_3095	-	CP	-4,99
148281596	Fumarylacetoacetat hydrolase	LpC_1748	-	CP	-4,98
166201397	S-adenosylmethionine synthase	LpC_1506	-	CP	-4,97
148280976	Hypothetical protein	LpC_1097	-	Unb.	-4,89
148281000	Aconitate hydratase	LpC_1121	-	CP	-4,85

166232201	Enolase	LpC_1523	-	CP	-4,72
148280177	Hypothetical protein	LpC_0256	+	Unb.	-4,61
148280977	Hypothetical protein	LpC_1098	+	Unb.	-4,52
148280002	Hypothetical protein	LpC_0090	+	CP	-4,43
148282420	Coenzyme A ligase	LpC_2593	-	CP	-4,37
215275355	Catalase-peroxidase 2	LpC_0271	+	PP	-4,37
148281366	Adenosylhomocysteinase	LpC_1505	-	CP	-4,15
166991391	2,3-biphosphoglycerate-independent	LpC_2845	-	CP	-4,11
148282201	Alanine dehydrogenase	LpC_2367	-	CP	-4,04
148281290	Hypothetical protein	LpC_1427	+	Unb.	-4,00
148281319	Organic hydroperoxide resistance protein OsmC	LpC_1458	-	CP	-3,88
148282850	Inorganic pyrophosphatase	LpC_3048	-	CP	-3,62
148282734	Glucoamylase	LpC_2921	-	Unb.	-3,51
166198380	Co-chaperonin GroES	LpC_2607	-	CP	-3,34
166977511	Protein-export protein	LpC_1773	-	CP	-3,29
190358155	ATP synthase subunit	LpC_3299	-	CP	-3,26
148280959	Myo-inositol catabolism protein IolD	LpC_1080	-	CP	-3,17
160187474	Triosephosphat isomerase	LpC_3078	-	CP	-3,16
148279954	Hypothetical protein	LpC_0042	-	PP	-2,56
148282310	Isocitrate dehydrogenase	LpC_2479	-	CP	-2,53
148281922	Secreted peptidase	LpC_2080	-	CP	-2,25

¹ *L. pneumophila* str. Corby, GenBank: CP000675.2, Assembly: GCA_000092545.1

² SignalP 4.0: Vorhersage der Präsenz und Lokalisation von Signalpeptiden in Aminosäure-Sequenzen

³ PSORTb 3.0.2: Vorhersage der Proteinlokalisierung

In Tabelle 5.3 sind die Proteine, geordnet nach ihren GI-Nummern, aufgezeigt, die nur im *L. pneumophila* Corby WT-, nicht jedoch im *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ -Sekretom vorkamen. Insgesamt wurden 171 Proteine identifiziert, die im Sekretom der *proA*-negativen Mutante im Vergleich zum Wildtyp dezimiert vorlagen (Daten nicht gezeigt).

5 Ergebnisse

Tabelle 5.3: Proteine, die nur im Wildtyp-Sekretom identifiziert wurden

GI-Nr.	Identität	Locus ¹	SigP ²	PSORT ³
148279921	Hypothetical protein	LpC_0009	-	CP
148280431	Metallopeptidase PepO	LpC_0534	+	CP
148280621	Glutaminyl-tRNA synthetase	LpC_0731	-	CP
148280657	3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase	LpC_0768	-	CP
148280668	Glutamine synthetase	LpC_0780	-	CP
148280699	Hypothetical protein	LpC_0811	-	CP
148280719	Citrate synthase	LpC_0831	-	CP
148280728	Aminotransferase	LpC_0840	-	CP
148280865	Pyruvate dehydrogenase E1 alpha	LpC_0980	-	CP
148280866	Pyruvate dehydrogenase E1 beta	LpC_0981	-	CP
148281084	Thioredoxin reductase	LpC_1208	-	PP/CM
148281088	Peptide maturation protein PmbA	LpC_1212	-	CP
148281150	Acetyl CoA Synthetase	LpC_1275	-	CP
148281225	ecto-NTPDase	LpC_1359	+	Unb.
148281342	Histidinol phosphate aminotransferase	LpC_1481	-	CP
148281521	Conserved hypothetical protein	LpC_1672	+	Unb.
148282237	Cystathionine beta-lyase	LpC_2403	-	CP
148282249	Pyridine nucleotide transhydrogenase	LpC_2416	-	CM
148282283	Tuloene tolerance protein Ttg2D	LpC_2451	+	Unb.
148282317	Hypothetical protein	LpC_2486	-	CP
148282383	Hypothetical signal peptide protein	LpC_2556	+	Unb.
148282448	Acetoacetate decarboxylase ADC	LpC_2621	-	CP
148282474	Trp repressor binding protein	LpC_2648	-	Unb.
148282485	Hypothetical protein	LpC_2660	-	Unb.
148282510	Alcohol dehydrogenase	LpC_2686	-	Unb.
148282582	Succinyl CoA synthetase alpha chain	LpC_2767	-	CP
148282687	Fructose biphosphate aldolase	LpC_2874	-	CP
148282705	IcmE (DotG)	LpC_2892	-	OM/EC
148283090	Zinc metalloprotease	LpC_3292	+	EC
166222566	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase	LpC_1780	-	CP
166226833	Glutamate tRNA ligase	LpC_1365	-	CP
166229295	DNA-directed RNA polymerase beta	LpC_3021	-	CP

166233426	3-hydroxyacyl dehydratase FabZ	LpC_2836	-	CP
189030250	Succinate CoA ligase subunit beta	LpC_2768	-	CP
205830130	Alanine tRNA ligase	LpC_1243	-	CP
238064759	Succinyl-diaminopimelate desuccinylase	LpC_2406	-	CP

¹ *L. pneumophila* str. Corby, GenBank: CP000675.2, Assembly: GCA_000092545.1

² SignalP 4.0: Vorhersage der Präsenz und Lokalisation von Signalpeptiden in Aminosäure-Sequenzen

³ PSORTb 3.0.2: Vorhersage der Proteinlokalisierung

Anhand des Student's *t*-Test konnten davon 45 Proteine als signifikant reduziert angesehen werden (vergleiche Tabelle 5.2). Von diesen signifikant dezimiert vorliegenden Proteinen wurde mit Hilfe des Programms SignalP in Version 4.0 für 11 Proteine eine Signalsequenz vorhergesagt. Zu den im Vergleich zum Wildtyp reduziert vorliegenden Proteinen mit Signalsequenz gehörten viele hypothetische Proteine sowie die Katalase/Peroxidase KatG, das TPR Repeat-Protein, eine Tyrosin-Phosphatase und die *Major acid phosphatase* Map. Dabei war die Katalase/Peroxidase in der *proA*-Deletionsmutante 20,67-fach, das TPR Repeat-Protein 106,89-fach und die Tyrosin-Phosphatase 1031,12-fach weniger im Sekretom der *proA*-defizienten Mutante präsent. Das Protein mit Signalsequenz, das am geringsten im Vergleich zum Wildtyp vorlag, war Map, welches 1552,09-fach geringer vorkam.

Mit dem Programm PSORT in Version 3.0.2 konnte weiterhin für einige Proteine die vermutete Lokalisation vorhergesagt werden. Interessanterweise konnten nur die Tyrosin-Phosphatase und Map eindeutig als extrazellulär identifiziert werden. KatG ist möglicherweise ein periplasmatisches Protein. Das hypothetische Protein LpC_0090 wurde sogar, trotz vorhergesagter Signalsequenz, als zytoplasmatisch identifiziert. Proteine, bei denen die mögliche Lokalisation nicht eindeutig festgestellt werden konnte, weisen vermutlich multiple *Location sites* auf. Das bisher nicht charakterisierte Protein LpC_0042 wies zwar keine Signalsequenz auf, jedoch konnte mit dem Programm PSORT 3.0.2 eine Lokalisation im Periplasma vorhergesagt werden.

Insgesamt konnten 36 Proteine nur im Sekretom von *L. pneumophila* Corby WT detektiert werden, nicht jedoch bei *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ (Tabelle 5.3). Hier konnte für 6 Proteine eine Signalsequenz vorhergesagt werden. Darunter befanden sich eine Ectonukleosid-triphosphat Diphosphohydrolase (Ecto-NTPDase), die Metalloproteinase PepO, die Zink-Metalloprotease LasB, das Toluol-Toleranz-Protein Ttg2D und zwei uncharakterisierte Proteine. Mit Hilfe des Programms PSORT konnte nur LasB

5 Ergebnisse

eindeutig als extrazellulär identifiziert werden. Für PepO wurde sowohl eine Signalsequenz als auch eine Lokalisation im Zytoplasma vorhergesagt. Die Lokalisation der anderen Proteine mit Signalsequenz konnte in diesem Fall nicht bestimmt werden. Möglicherweise haben diese Proteine mehrere *Location sites*. Die Thioredoxin reductase LpC_1208 wies zwar keine Signalsequenz auf, jedoch wurde mit PSORT eine Lokalisierung im Periplasma oder der Zytoplasmamembran vorhergesagt. Auch DotG wies keine Signalsequenz auf. Jedoch wurde dieses schon in früheren Studien als zentrale Komponente des T4SS identifiziert (Nagai and Kubori, 2011).

Die massenspektrometrische Analyse der Sekretome von *L. pneumophila* Corby WT und *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ ergaben also deutliche Unterschiede. Interessanterweise waren dabei viele Proteine bei der *proA*-negativen Mutante dezimiert oder gar nicht vorhanden. Mit Hilfe der Gen- und Genomdatenbank KEGG konnten Vorhersagen für mögliche Funktionen der einzelnen Proteine getroffen und diese kategorisiert werden (Abb. 5.16). Im Sekretom der *proA*-Deletionsmutante waren viele Proteine mit Funktionen im Kohlenhydrat-, Energie- oder Aminosäure-Metabolismus dezimiert oder gar nicht vorhanden. Weiterhin kamen auch einige Proteine, die am Lipid-Metabolismus beteiligt sind, nicht im Sekretom von *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ (11 % der nur im Wildtyp-Sekretom vorkommenden Proteine) vor. Dazu zählte unter anderem die Acetoacetat-Decarboxylase ADC oder die 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase. Ein etwas kleinerer Anteil (4-5 %) waren virulenzassoziierte Proteine wie die *Major acid phosphatase*. Etwa 7 % der im Sekretom der *proA*-negativen Mutante signifikant dezimierten Proteine war in die Proteinfaltung, -sortierung oder -degradation involviert. Der Anteil der nur im Wildtyp-Sekretom vorkommenden Proteine lag bei 4 %. Einige der im Sekretom von *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ nicht vorkommenden Proteine waren weiterhin am Metabolismus von Kofaktoren und Vitaminen (9 %, z.B. Pyridin Nukleotid-Transhydrogenase) oder an der RNA-Biogenese und -Degradation (7 %, z.B. Glutaminyl-tRNA-Synthase) beteiligt. Ein kleinerer Anteil (jeweils 2-4 %) der im Sekretom der *proA*-Deletionsmutante dezimiert oder nicht vorkommenden Proteine waren in die Degradation und den Metabolismus von Xenobiotika (Fumarylacetoacetat-Hydrolase), den Proteinexport (SecB), am Aufbau der Zellhülle (LPS-Biosyntheseprotein LpC_2544), die Stressantwort (KatG und OsmC), die Biosynthese von Sekundärmetaboliten (4-Hydroxy-tetrahydrodipicolinat Synthase), Signaltransduktion oder die Transkription involviert (RNA-Polymerase β -Untereinheit).

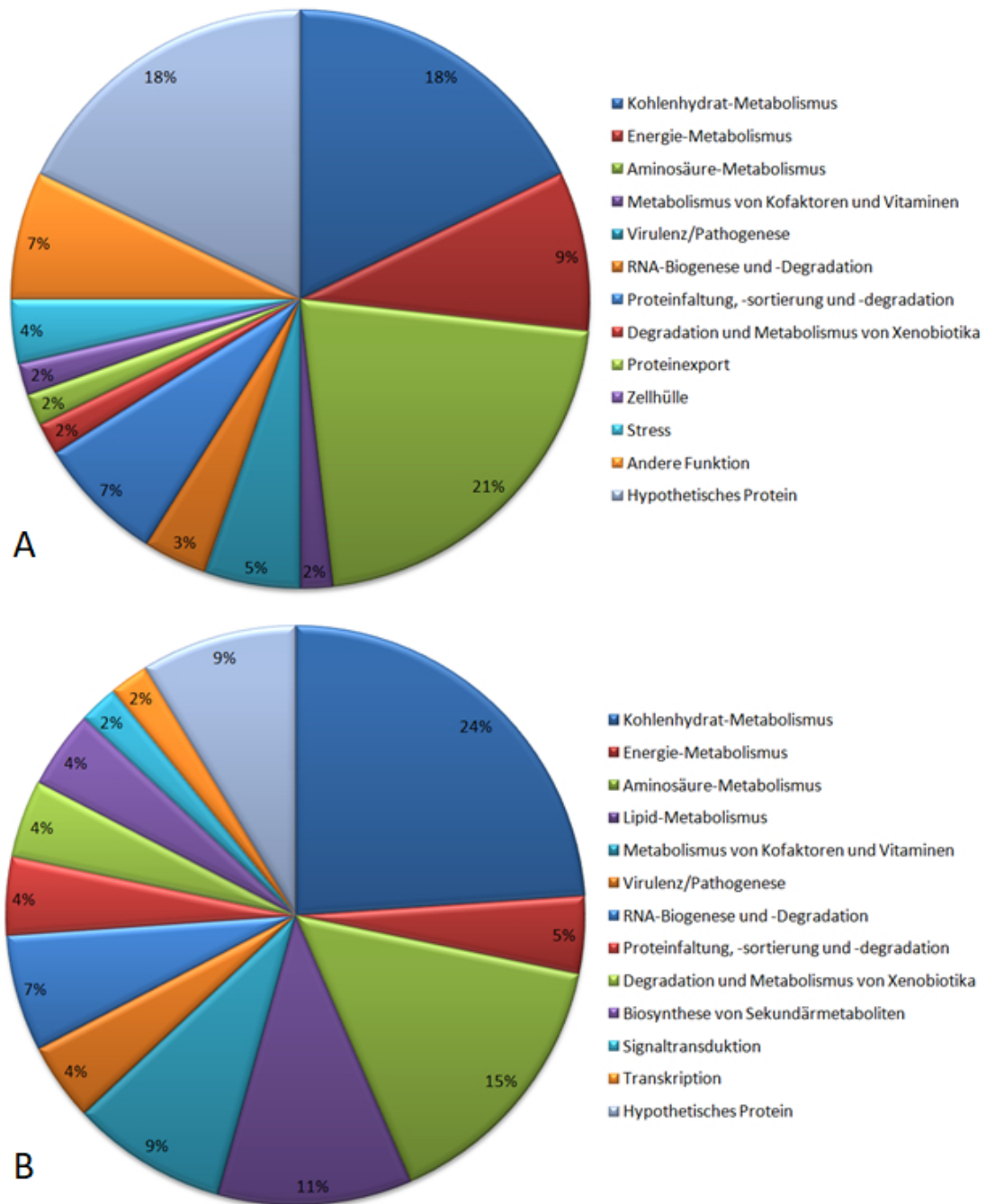


Abbildung 5.16: Postulierte Funktionen der im Sekretom der *proA*-Deletionsmutante dezimierten sowie nur im Wildtyp-Sekretom vorkommenden Proteine. (A) Mögliche Funktionen der im *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ -Sekretom dezimierten Proteine. (B) Mögliche Funktionen der nur im *L. pneumophila* Corby WT-Sekretom vorkommenden Proteine. Mehrfachnennungen sind durch multiple Proteinfunktionen möglich. Vorhersage anhand der Gen- und Genomdatenbank KEGG.

5 Ergebnisse

Etwa 7 % der im Sekretom der *proA*-defizienten Mutante dezimiert vorliegenden Proteine konnte keiner der genannten Funktionen zugeordnet werden. Des Weiteren waren 18 % der im Sekretom von *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ dezimierten und bei 9 % der nur im Wildtyp-Sekretom vorkommenden Proteine hypothetische Proteine.

Um auszuschließen, dass es bei der Isolation des Sekretoms möglicherweise zu einer Zelllyse des Wildtyps gekommen war, wurden Proben aus stationären Flüssigkulturen von *L. pneumophila* Corby WT und *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ in seriellen Verdünnungen auf BCYE-Agar ausplattiert. Anschließend wurden die Bakterien, wie bei der Isolation des Sekretoms, zentrifugiert und erneut Proben ausplattiert. Nach Auszählen der gewachsenen Kolonien wurde die jeweilige *cfu*/mL bestimmt und die Werte vor und nach der Zentrifugation miteinander verglichen (Abb. 5.17).

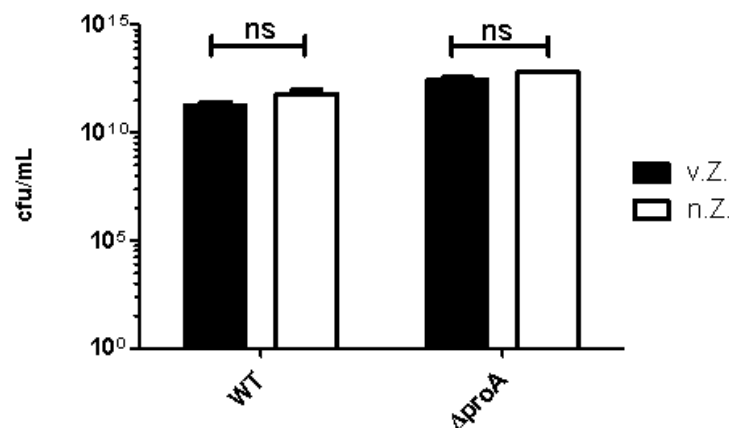


Abbildung 5.17: Bestimmung der koloniebildenden Einheiten vor und nach der Zentrifugation. Flüssigkulturen von *L. pneumophila* Corby WT und *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ wurden in YEB-Medium auf eine OD_{600} von 3,2 - 3,4 wachsen gelassen. Durch Ausplattieren auf BCYE-Agarplatten wurde die jeweilige *cfu*/mL vor (schwarz) und nach (weiß) der Zentrifugation bestimmt. Die Signifikanz wurde mittels Student's *t*-Test ermittelt. Bei beiden Stämmen konnte kein signifikanter Unterschied in der *cfu*/mL beobachtet werden. Die Vitalität der Zellen wurde somit durch das Isolationsverfahren nicht beeinträchtigt. \pm SD.

Die ermittelte *cfu*/mL des Wildtyps vor der Zentrifugation lag durchschnittlich bei $1,9 \times 10^{11}$, danach bei $6,5 \times 10^{11}$. Bei der *proA*-Deletionsmutante lag die durchschnittliche *cfu*/mL vor der Zentrifugation bei $3,1 \times 10^{12}$, danach bei $7,7 \times 10^{12}$. Das Verfahren zur Isolation des Sekretoms hatte somit keine Auswirkungen auf die Vitalität der Legionellen. In anschließenden Untersuchungen wurden die Auswirkungen des veränderten Sekretoms auf den Phänotyp von *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ analysiert, um die Ergebnisse der Massenspektrometrie zu verifizieren (siehe Kapitel 5.3).

5.2.6 ProA hat keinen Einfluss auf das Sekretomprofil in CDM

In nährstoffreichem YEB-Medium konnten deutliche Unterschiede im Sekretionsprofil zwischen *L. pneumophila* Corby WT und *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ detektiert werden. In weiteren Versuchen im Rahmen einer Masterarbeit von Lina Scheithauer (2016) wurde nun der Einfluss von ProA auf die Proteinsekretion in nährstoffarmem CDM untersucht. Dazu wurden 50 mL-Kulturen beider Stämme in CDM angesetzt und der Kulturüberstand nach Erreichen der stationären Phase bei OD₆₀₀ 1,5 isoliert und sterilfiltriert. Die Sekretomproteine wurden mit TCA gefällt und nach mehreren Waschschritten mit Ethanol in einem geringen Volumen Rehydratisierungspuffer gelöst. Mittels Bradford-Assay mit Roti[®]-Nanoquant wurden die Proteinkonzentrationen bestimmt. Da die Proteinkonzentrationen beider Stämme in allen Wachstumsphasen gleich waren, wurden für die SDS-PAGE je 20 µg Protein pro Stamm eingesetzt (siehe Kapitel 5.2.3). Das SDS-Gel wurde mit Coomassie Silver-Blue gefärbt und das Sekretionsprofil von Wildtyp und *proA*-negativer Mutante miteinander verglichen. Weiterhin wurde ein Western Blot durchgeführt und ProA mittels spezifischem anti-ProA Antikörper und Alkalischer Phosphatase-Reaktion detektiert (Abb. 5.18).

Für die Sekretionsprofile von *L. pneumophila* Corby WT (1) und *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ (3) waren auf dem Coomassie Silver-Blue-gefärbtem SDS-Gel in CDM keine signifikanten Unterschiede erkennbar (Abb. 5.18 A). Beide Stämme zeigten zwei distinkte Banden. Eine lag knapp über 70 kDa-Markerbande, die zweite etwas unterhalb der 55 kDa-Markerbande. Weiterhin waren bei sämtlichen Molekulargewichten nicht weiter spezifizierbare Proteinbanden zu erkennen. Auffällig war hier das Fehlen der ProA-Bande bei 38 kDa. Im Western Blot konnten mittels spezifischem anti-ProA Antikörper eine dominante Bande bei 40 kDa und weniger stark ausgeprägte, diffuse Banden mit geringerem Molekulargewicht detektiert werden (Abb. 5.18 B). Somit konnten keine Unterschiede im Sekretionsprofil von *L. pneumophila* Corby WT und *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ bei Wachstum in CDM beobachtet werden. Jedoch lag ein deutlicher Unterschied zum Sekretionsprofil bei Wachstum in YEB-Medium vor (vergleiche Kapitel 5.2.4). ProA konnte zwar in CDM nachgewiesen werden, jedoch in stark reduzierter Konzentration. Um zu analysieren, ob das *Major secretory protein* bei Kultivierung in CDM möglicherweise weniger sezerniert wird, wurden weiterhin die Proteine der Zellpellets von Wildtyp und *proA*-negativer Mutante untersucht. Auf dem Coomassie Silver-Blue-gefärbten SDS-Gel ließen sich zahlreiche Protein-

5 Ergebnisse

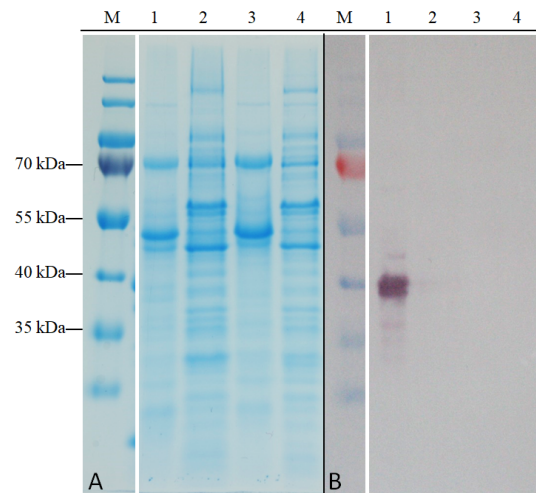


Abbildung 5.18: Vergleich der Proteinprofile des Wildtyps und der *proA*-defizienten Mutante in CDM. Kulturen von *L. pneumophila* Corby WT und *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ wurden nach Kultivierung in CDM in der Stationärphase geerntet. Die Proteine des Kulturüberstands wurden mittels TCA gefällt und aufkonzentriert, Proteine der Zellpellets wurden durch Aufkochen in 4 x SDS-Ladepuffer gewonnen. Der Nachweis erfolgte auf dem SDS-Gel (links) durch Coomassie Silver-Blue. Im Western Blot (rechts) wurde ProA durch einen spezifischen anti-ProA Antikörper und Alkalische Phosphatase-Reaktion detektiert. Pro Stamm wurden jeweils 20 μ g Protein aufgetragen, als Marker (M) wurde die PageRuler™ Prestained Protein Ladder von Thermo Scientific verwendet. (1) Sekretom des Wildtyps, (2) Zellpellet des Wildtyps, (3) Sekretom der *proA*-defizienten Mutante, (4) Zellpellet der *proA*-defizienten Mutante. ProA konnte nur im Sekretom von *L. pneumophila* Corby WT nachgewiesen werden.

banden im Zellpellet beider Stämme nachweisen (Abb. 5.18 A). Dabei waren keine Unterschiede zwischen Wildtyp (2) und *proA*-negativer Mutante (4) zu verzeichnen. Distinkte Banden konnten bei 70 kDa, ca. 60 kDa und ca. 50 kDa beobachtet werden. Weiterhin waren viele unterschiedlich stark ausgeprägte bis diffuse Banden bei sämtlichen Molekulargewichten detektierbar. Bei 38 kDa, was dem Molekulargewicht des sezernierten ProA entspricht, war auf dem SDS-Gel keine Bande zu erkennen. Mittels spezifischem anti-ProA Antikörper und Alkalischer Phosphatase-Reaktion konnte im Sekretom des Wildtyps ProA eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 5.18 B). Sowohl im Zellpellet von *L. pneumophila* Corby WT (2) als auch in *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ (4) konnte keine spezifische Antikörperreaktion für ProA detektiert werden. Somit lag bei Kultivierung in CDM keine verminderte Sekretion der Protease vor. Im Vergleich zum nährstoffreichen YEB-Medium besteht CDM nur aus Aminosäure-Zusätzen. Proteinhaltige Zugaben wie Hefeextrakt oder Pepton sind dagegen nicht enthalten. Somit könnte das verminderte Vorhandensein von ProA auf einen niedrigeren Proteingehalt des Mediums zurückzuführen sein. Um zu analysieren, ob die Zuga-

be bestimmter Proteine oder proteinhaltiger Zusätze die Produktion der Protease in CDM wieder auf ein YEB-ähnliches Level anhebt, wurden Kulturen von *L. pneumophila* Corby WT und *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ jeweils in CDM ohne Zusatz, mit 1 $\mu\text{g/mL}$ Casein, 1 $\mu\text{g/mL}$ humanem Lungenproteom oder 1 $\mu\text{g/mL}$ THP-1-Proteom kultiviert. Weiterhin wurde die Möglichkeit einer Kalzium-abhängigen Produktion, wie der zu ProA homologen Elastase aus *P. aeruginosa*, untersucht (Olson and Ohman, 1992). Dafür wurden der Wildtyp und die *proA*-negative Mutante in Kalzium-freiem CDM inkubiert, um zu analysieren, ob es dabei zu einer kompletten Inhibition der ProA-Produktion kommt (Abb. 5.19).

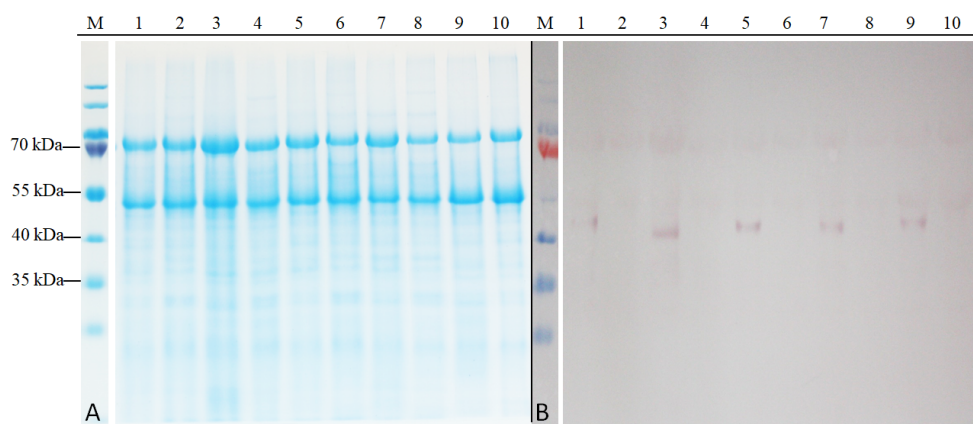


Abbildung 5.19: Einfluss von unterschiedlichen Proteinquellen und Ca^{2+} -Defizienz auf die Produktion von ProA in CDM. Wildtyp und *proA*-defiziente Mutante wurden in CDM unter Zusatz unterschiedlicher Proteine oder Proteinextrakte, bzw. in CDM ohne Kalzium inkubiert. Das Sekretom wurde durch TCA-Fällung der Kulturüberstände isoliert und die enthaltenen Proteine via SDS-PAGE aufgetrennt. Der Nachweis der Proteine auf dem SDS-Gel (A) erfolgte mit Coomassie Silver-Blue. ProA wurde im Western Blot (B) mittels spezifischem anti-ProA Antikörper und Alkalischer Phosphatase-Reaktion detektiert. Es wurden jeweils 20 μg Protein pro Stamm aufgetragen, als Marker (M) wurde die PageRuler™ Prestained Protein Ladder von Thermo Scientific verwendet. (1) Sekretom von *L. pneumophila* Corby WT, (2) Sekretom von *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$, (3) *L. pneumophila* Corby WT + 1 $\mu\text{g/mL}$ Casein, (4) *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ + 1 $\mu\text{g/mL}$ Casein, (5) *L. pneumophila* Corby WT + 1 $\mu\text{g/mL}$ humanes Lungenproteom, (6) *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ + 1 $\mu\text{g/mL}$ humanes Lungenproteom, (7) *L. pneumophila* Corby WT + 1 $\mu\text{g/mL}$ THP-1-Proteom, (8) *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ + 1 $\mu\text{g/mL}$ THP-1-Proteom, (9) *L. pneumophila* Corby WT in CDM ohne Ca^{2+} , (10) *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ in CDM ohne Ca^{2+} . Die Inkubation mit verschiedenen Proteinzusätzen sowie in CDM ohne Kalzium führte zu keiner Veränderung in der ProA-Produktion.

Auf dem SDS-Gel waren dabei keine Unterschiede zwischen den einzelnen Proben zu erkennen. Alle Bedingungen wiesen zwei dominante Proteinbanden bei etwas mehr als 70 kDa und knapp unterhalb der 55 kDa-Markerbande auf sowie viele, teils diffuse Banden bei allen Molekulargewichten. Auch der Nachweis von ProA mittels Western Blot ergab keine Unterschiede bei Inkubation der Legionellen-Stämme mit Prote-

in, Proteinextrakten oder in CDM ohne Kalzium. Nur bei den Wildtyp-Proben waren Proteinbanden mit gleicher Ausprägung bei ca. 40 kDa erkennbar. Somit konnte die Produktion von ProA nicht durch Zugabe von Protein oder Proteinextrakten erhöht werden. Auch eine Kalzium-abhängigkeit konnte bei diesen Untersuchungen ausgeschlossen werden.

5.3 Phänotypische Untersuchung der *proA*-Deletionsmutante in Bezug auf das veränderte Sekretom

Die massenspektrometrische Untersuchung des Sekretoms von *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ und der Vergleich mit *L. pneumophila* Corby WT ergaben deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung beider Sekretome. Dabei zeigte sich, dass viele Proteine im Kulturüberstand der *proA*-Deletionsmutante unterrepräsentiert oder auch gar nicht vorhanden waren (vergleiche Kapitel 5.2.5). In weiteren Analysen sollten anschließend die phänotypischen Auswirkungen dieses veränderten Sekretoms untersucht und gleichzeitig die Ergebnisse der Massenspektrometrie verifiziert werden. Dazu wurden zwei, im Sekretom der *proA*-negativen Mutante dezimiert vorliegende Proteine identifiziert, die bereits in früheren Analysen untersucht wurden und deren inaktive Mutanten einen phänotypisch nachweisbaren Effekt zeigten. Dabei handelte es sich zum einen um die Katalase/Peroxidase KatG (LpC_0271), welche im Sekretom der *proA*-negativen Mutante 20,67-fach weniger vorkam. Zum anderen konnte die Tyrosin-Phosphatase LpC_3106 identifiziert werden, die im Sekretom von *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ 1031,12-fach reduziert vorlag. In weiteren Experimenten sollte untersucht werden, ob die *proA*-negative Mutante möglicherweise ähnliche phänotypisch nachweisbare Effekte zeigt, wie inaktive Mutanten bzw. Deletionsmutanten von KatG (KatA) und der Tyrosin-Phosphatase (LppA). Die Ergebnisse werden in den folgenden Unterkapiteln behandelt.

5.3.1 ProA hat keinen Einfluss auf das Wachstum in Anwesenheit von H₂O₂

L. pneumophila besitzt zwei bifunktionale Katalasen/Peroxidasen. In *L. pneumophila* Philadelphia JR32 sind diese als KatA und KatB annotiert. Mutanten von *L. pneumophila* Philadelphia JR32, in denen KatA inaktiviert wurde, zeigten sich sensitiv gegenüber exogenem H₂O₂ und ein verringertes Überleben in der stationären Phase (Bandyopadhyay and Steinman, 2000). Sequenzvergleiche von der im Sekretom von *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ weniger vorkommenden KatG (*katG*) mit dem Programm BLAST ergaben eine 99 %-ige Identität mit KatA (*katA*). Um zu überprüfen, ob für *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ durch das verringerte Vorkommen der Katalase/Peroxidase im Sekretom ein Einfluss auf das Wachstum in Anwesenheit von H₂O₂ detektiert werden kann, wurden Kulturen von *L. pneumophila* Corby WT und *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ zunächst auf eine Zellzahl von 1×10^8 Zellen/mL eingestellt. Serielle Verdünnungen der Kulturen wurden auf eckige BCYE-Agarplatten, die verschiedene H₂O₂-Konzentrationen (200 mM, 300 mM und 400 mM) enthielten, aufgetropft und nach Inkubation von 3-4 Tagen bei 37 °C fotografisch dokumentiert. Weiterhin wurden die koloniebildenden Einheiten bestimmt (Abb. 5.20).

Auf den BCYE-Agarplatten war bei allen H₂O₂-Konzentrationen sowohl für *L. pneumophila* Corby WT als auch für *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ für alle Verdünnungsstufen ein Wachstum zu erkennen. Die Legionellen wuchsen dabei kreisförmig, da die Kulturen als 10 µL-Tropfen auf die Agarplatten gegeben wurden. Einzelne Kolonien waren ab einer Verdünnung von 10^{-5} , bzw. einer eingestellten Zellzahl von 10^3 /mL zu beobachten. Da das Wachstum beider Stämme bei allen H₂O₂-Konzentrationen visuell relativ identisch schien, wurden anschließend nur die koloniebildenden Einheiten nach Wachstum in Anwesenheit der höchsten Wasserstoffperoxid-Konzentration, bei 400 µM, bestimmt (siehe Abb. 5.20 D). Bei Wachstum auf BCYE-Agarplatten in Anwesenheit von H₂O₂ konnten keine Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der *proA*-negativen Mutante detektiert werden.

Da H₂O₂ sehr instabil ist und sich bei der Zugabe in noch flüssiges, warmes Agar-Medium sowie der langen Inkubationszeit der Legionellen von 3-4 Tagen leicht zersetzt, wurden die Analysen auch in flüssigem YEB-Medium durchgeführt. Dazu wurden Kulturen von *L. pneumophila* Corby WT und *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ in YEB-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,01 eingestellt. Die Bakterien wurden in Anwesenheit von 0 mM, 0,039 mM, 0,078 mM, 0,156 mM, 0,313 mM, 0,625 mM, 1,25 mM,

5 Ergebnisse

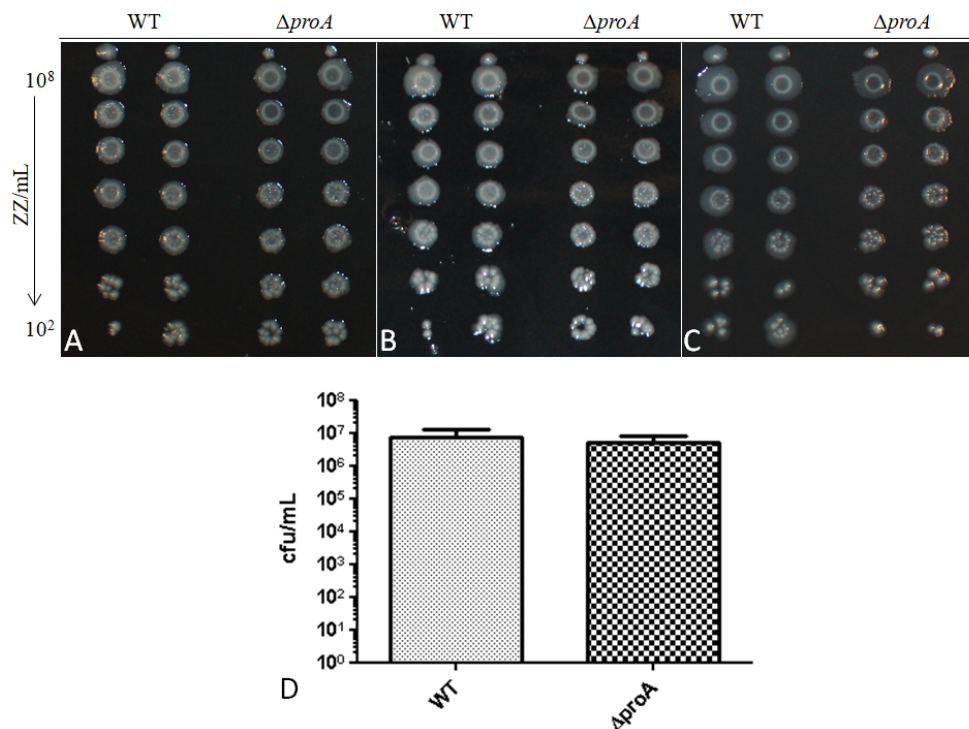


Abbildung 5.20: Wachstum von *L. pneumophila* Corby WT und *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ auf BCYE-Agar mit H_2O_2 . Kulturen von *L. pneumophila* Corby WT und *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ wurden auf eine Zellzahl von 1×10^8 eingestellt und in serieller Verdünnung auf BCYE-Agarplatten mit (A) 200 mM, (B) 300 mM und (C) 400 mM H_2O_2 ausplattiert und für 3-4 Tage bei 37 °C inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden ausgezählt und die koloniebildenden Einheiten pro mL (cfu/mL) bestimmt (D). Hierbei wurden die Ergebnisse aus vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten berücksichtigt. Dargestellt sind die cfu/mL nach Inkubation in Anwesenheit von 400 μM H_2O_2 . Es wurden für die *proA*-negative Mutante im Vergleich zum Wildtyp keine Unterschiede im Wachstum auf BCYE-Agar mit H_2O_2 beobachtet. \pm SD: Standardabweichung der Einzelwerte aus vier unabhängigen Experimenten.

2,5 mM, 5 mM und 10 mM H_2O_2 in 96-well-Platten für 24 h bei 37 °C und 200 rpm schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die OD_{600} bestimmt (Abb. 5.21).

Bei Inkubation ohne H_2O_2 und in Anwesenheit von niedrigen Wasserstoffperoxid-Konzentrationen (0,039 mM und 0,078 mM) lagen die OD_{600} von *L. pneumophila* Corby WT und *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ mit Werten zwischen 0,4 und 0,44 am höchsten. Dabei waren jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Stämmen zu verzeichnen. Bei einer H_2O_2 -Konzentration von 0,156 mM lag die mittlere OD_{600} des Wildtyps nur noch bei ca. 0,32, die OD_{600} der *proA*-negativen Mutante bei ca. 0,39. Somit konnte durch die Erhöhung des Wasserstoffperoxids eine leichte Reduktion des Wachstums für beide Stämme beobachtet werden, wobei diese für den Wildtyp sogar etwas stärker ausfiel. Jedoch waren diese Unterschiede nicht signi-

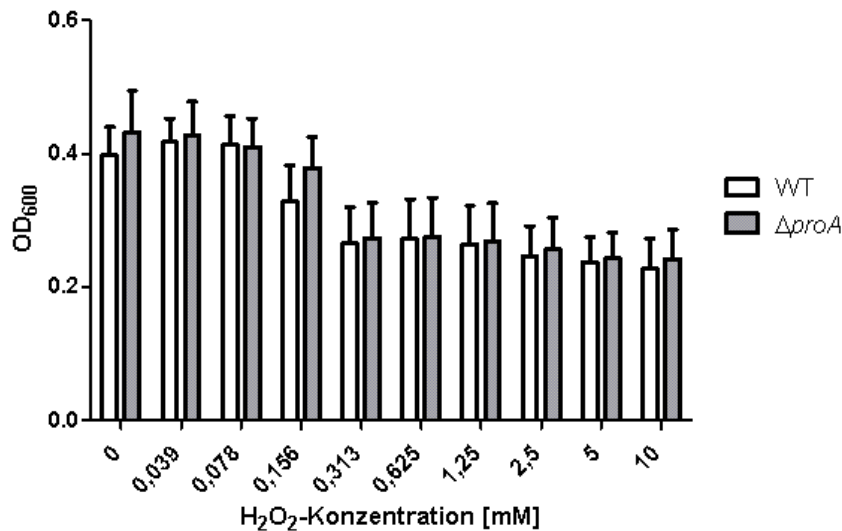


Abbildung 5.21: Wachstum von *L. pneumophila* Corby WT und *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ in YEB in Anwesenheit von H_2O_2 . Kulturen von *L. pneumophila* Corby WT und *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ wurden in YEB-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,01 eingestellt. In 96-well-Platten wurden die Bakterien in Anwesenheit von 0 mM, 0,039 mM, 0,078 mM, 0,156 mM, 0,313 mM, 0,625 mM, 1,25 mM, 2,5 mM, 5 mM und 10 mM H_2O_2 über 24 h inkubiert. Anschließend wurde die OD₆₀₀ bestimmt. Die Ergebnisse wurden aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten berechnet. Bei sämtlichen H_2O_2 -Konzentrationen waren keine Unterschiede im Wachstum zwischen dem Wildtyp und der *proA*-defizienten Mutante zu beobachten. \pm SD: Standardabweichung der Einzelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

fikant. In Anwesenheit von 0,313 mM H_2O_2 im Medium konnte für *L. pneumophila* Corby WT und *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ eine OD₆₀₀ von ungefähr 0,28 gemessen werden. Damit reduzierte sich, durch die Erhöhung der H_2O_2 -Konzentration, das Wachstum beider Stämme um ca. 30-36 % im Vergleich zum Wachstum ohne H_2O_2 -Zugabe. In Anwesenheit von 0,625-10 mM H_2O_2 verringerte sich die OD₆₀₀ für beide Stämme nur noch geringfügig bis auf ungefähr 0,28. Es wurde auch eine Konzentration von 20 mM H_2O_2 eingesetzt. Jedoch ergaben die späteren Auswertungen teils negative Werte, weshalb sie für die weitere Berechnung nicht berücksichtigt wurden. Allerdings ließen diese Ergebnisse darauf schließen, dass das Wachstum von *L. pneumophila* in Anwesenheit von 20 mM H_2O_2 gehemmt wurde.

Zusammenfassend zeigten die Resultate beider Versuche, dass ein 20,67-fach geringeres Vorkommen von KatG im Sekretom der *proA*-negativen Mutante keinen Einfluss auf das Wachstum in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid, sowohl auf Festmedien als auch in Flüssigkultur, hat.

5.3.2 ProA beeinflusst das *Stationary Phase Survival*

Für die Katalase/Peroxidase KatA aus *L. pneumophila* Philadelphia JR32, das Homolog zu KatG aus *L. pneumophila* Corby, konnte ein Einfluss auf das Überleben der Bakterien in der stationären Phase (*Stationary Phase Survival*) festgestellt werden. So war bei *katA*-Nullmutanten das Überleben der Legionellen im Vergleich zum Wildtyp um 100-10.000-fach reduziert. Da KatA ein periplasmatisches Protein ist, hilft es den Bakterien durch seine Peroxidase-Aktivität in Gegenwart von H_2O_2 zu überleben, welches bei Kulturen in der Stationärphase vermehrt außerhalb des Zytoplasmas entsteht (Bandyopadhyay and Steinman, 2000). Um zu überprüfen, ob ein verringertes Vorkommen von KatG im Sekretom der *proA*-negativen Mutante einen Einfluss auf das *Stationary Phase Survival* hat, wurden 250 mL-Kulturen von *L. pneumophila* Corby WT und *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ in YEB-Medium mit einer Anfangs- OD_{600} von 0,03 inokuliert und über 4 Tage bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. In Abständen von ca. 12 h wurde die OD_{600} vermessen und die Kulturen in seriellen Verdünnungen auf BCYE-Agarplatten ausplattiert. Nach ca. 3-4 Tagen Inkubation der Platten bei 37 °C wurden die gewachsenen Kolonien gezählt und die *cfu*/mL der jeweiligen Zeitpunkte bestimmt. Aus den logarithmierten Werten wurde eine Vier-Parameter-Generalisierung der logistischen Kurve erstellt, die das Wachstum und Absterben einer Population einschließt (Jolicoeur and Pontier, 1989) (Abb. 5.22).

Zu Beginn des Wachstumsversuches (0 h) waren die ermittelten koloniebildenden Einheiten von *L. pneumophila* Corby WT und *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ relativ ähnlich. Beim Wildtyp lag diese durchschnittlich bei $1,9 \times 10^7$ *cfu*/mL, bei der *proA*-Deletionsmutante bei $1,5 \times 10^7$ *cfu*/mL. Auch nach 18 h Inkubation konnten für beide Stämme ähnliche Werte von $3,8 \times 10^9$ *cfu*/mL (Wildtyp) und $6,7 \times 10^9$ *cfu*/mL (*proA*-negative Mutante) bestimmt werden. Das Maximum der logistischen Wachstumskurve des Wildtyps wurde nach ca. 39 h mit ungefähr $1,5 \times 10^{12}$ *cfu*/mL erreicht. Ähnliche *cfu*-Werte konnten auch für das Maximum der *proA*-Deletionsmutante bestimmt werden. Jedoch erreichte diese die maximale *cfu*/mL erst nach ca. 49 h. Das Wachstum der *proA*-defizienten Mutante schien somit verzögert im Vergleich zum Wildtyp. Die Absterbephase konnte für *L. pneumophila* Corby WT ab ca. 42 h nach Beginn des Versuchs beobachtet werden. Die durchschnittliche *cfu* sank dabei zunächst leicht auf $1,2 \times 10^{12}$ /mL und reduzierte sich nach 65 h weiter auf $2,0 \times 10^6$ /mL. Nach 96 h erreichte der Wildtyp eine durchschnittliche *cfu*/mL von $1,0 \times 10^2$. Die Absterbephase der *proA*-Deletionsmutante begann erst nach ungefähr 54 h nach Beginn des Expe-

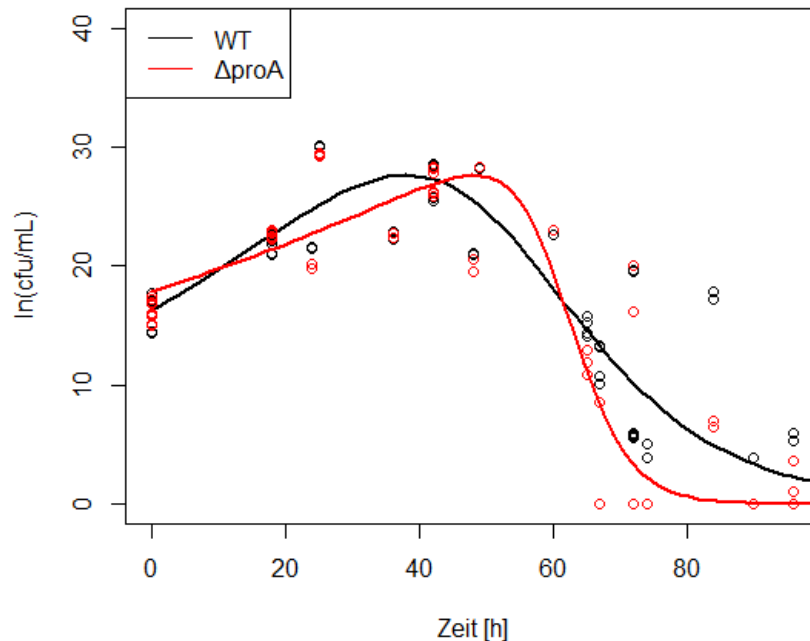


Abbildung 5.22: Stationary Phase Survival von *L. pneumophila* in YEB-Medium. Flüssigkulturen von *L. pneumophila* Corby WT (schwarz) und *L. pneumophila* Corby (rot) wurden über mehrere Tage inkubiert. In Abständen von ca. 12 h wurde die OD_{600} gemessen und die Kulturen auf BCYE-Agar ausplattiert. Die gewachsenen Kolonien wurden gezählt und die cfu/mL bestimmt. Dargestellt ist der natürliche Logarithmus der cfu/mL in Relation zur Zeit. Daraus wurde eine Vier-Parameter-Generalisierung der logistischen Kurve nach Jolicoeur and Pontier (1989) erstellt. Die Ergebnisse wurden aus drei unabhängigen Experimenten, jeweils in Doppelbestimmung, zusammengefasst. Für die *proA*-Deletionsmutante konnte im Vergleich zum Wildtyp ein deutlich schnelleres Absterben in der stationären Phase beobachtet werden.

riments, jedoch verlief diese deutlich schneller als beim Wildtyp. So lag die durchschnittliche cfu nach 65 h bei $1,3 \times 10^5/mL$ und war somit im Vergleich zum Wildtyp signifikant reduziert. Nach 72 h konnten bereits teilweise keine Kolonien mehr auf den BCYE-Agarplatten ausgezählt werden. Nach ca. 90 h erreichte die Absterbekurve von *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ ihren Nullpunkt. Die Ergebnisse dieses Versuches zeigten, dass eine Deletion des *proA*-Gens zu einer Verminderung des *Stationary Phase Survival* von *L. pneumophila* führt. Weiterhin konnte durch Bestimmung der cfu nachgewiesen werden, dass die *proA*-Deletionsmutante ein verzögertes Wachstum in YEB-Medium aufweist.

5.3.3 ProA beeinflusst das Wachstum in Anwesenheit von Phytat

Als Umweltbakterium kolonisiert *L. pneumophila* Biofilme und Protozoen. In diesen Umgebungen ist die Komponente Hexa-Phospho-Inosit (Phytat) allgegenwärtig und dient als Phosphatspeicher und Siderophor. In *L. pneumophila* Philadelphia JR32 wurde kürzlich das Dot/Icm-Substrat LppA, eine Phytat-Phosphatase, charakterisiert. Eine Deletionsmutante von *lppA* zeigte ein verringertes Wachstum in Anwesenheit von Phytat im Vergleich zum Wildtyp-Stamm. Weiterhin konnte sich die *lppA*-negative Mutante schlechter in Phytat-beladenen *A. castellanii* sowie *D. discoideum* replizieren (Weber et al., 2014). Die im Sekretom von *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ weniger vorkommende Tyrosin-Phosphatase LpC_3106 weist eine 98 %-ige Identität mit LppA auf. In weiteren Versuchen wurde daher analysiert, ob für die *proA*-defiziente Mutante ebenfalls ein Wachstumsnachteil in Anwesenheit von Phytat bestand.

Es wurden Wachstumsversuche mit *L. pneumophila* Corby WT und *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ in 96-well-Platten in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentration an Phytat (0-20 mM) angesetzt (Abb. 5.23). Die Anfangs-OD₆₀₀ betrug 0,1. Nach Inkubation von 5 Tagen bei 24 °C und 250 rpm wurde die OD₆₀₀ gemessen. Als Kontrolle wurden *L. pneumophila* Corby WT und *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ ohne Phytat-Zugabe (0 mM) inkubiert. Hier zeigte sich kein Unterschied im Wachstum nach 5 d bei 24 °C. Die Phytat-Konzentration im Medium wurde schrittweise erhöht. Es ergaben sich für beide Stämme sinkende OD₆₀₀-Werte in Relation zur steigenden Phytat-Konzentration. Auffällig war, dass die OD₆₀₀ des Wildtyps bei Phytat-Zugabe stets niedriger ausfiel, als die der *proA*-defizienten Mutante. So lag die mittlere OD₆₀₀ von *L. pneumophila* Corby WT bei 2 mM Phytat im Medium bei 0,96, bei *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ jedoch bei 1,05. Noch deutlicher wurde der Unterschied bei höheren Konzentrationen wie beispielsweise bei 8 mM Phytat. Hier konnte für den Wildtyp eine durchschnittliche OD₆₀₀ von 0,69 und für die *proA*-negative Mutante eine OD₆₀₀ von 0,87 detektiert werden. Jedoch waren die Unterschiede bis zu einer Phytat-Konzentration von 10 mM nicht signifikant unterschiedlich. Erst bei 15 mM Phytat im Medium konnte eine signifikante Differenz nachgewiesen werden. Die mittlere OD₆₀₀ von *L. pneumophila* Corby WT lag bei 0,18 und von *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ bei 0,45. Bei Anwesenheit von 20 mM Phytat im Medium wurde für beide Stämme kein Wachstum mehr gemessen. Die Ergebnisse dieses Experiments ergaben ein im Vergleich zum Wildtyp verbessertes Wachstum von *proA*-defiziente Mutante in Anwesenheit von Phytat.

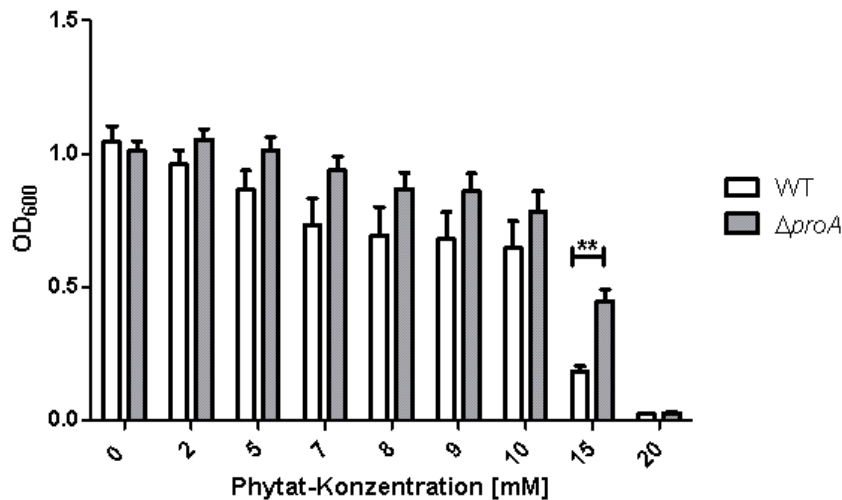


Abbildung 5.23: Wachstum von *L. pneumophila* Corby WT und *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ in Anwesenheit von Phytat. Kulturen von *L. pneumophila* Corby WT und *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ wurden in YEB-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt. In 96-well-Platten wurden die Bakterien in Anwesenheit von 0 mM, 2 mM, 5 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 15 mM und 20 mM Phytat über 5 d bei 24 °C inkubiert. Anschließend wurde die OD₆₀₀ bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse aus sechs unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. In Anwesenheit von 15 mM Phytat konnte für die *proA*-defiziente Mutante ein signifikant verbessertes Wachstum festgestellt werden. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's *t*-Test ermittelt (** $p \leq 0,01$), \pm SEM.

5.3.4 ProA beeinflusst die intrazelluläre Replikation in *A. castellanii* in Anwesenheit von Phytat

In früheren Versuchen konnte für eine *lppA*-defiziente Mutante von *L. pneumophila* Philadelphia JR32 eine verminderte Replikation in Phytat-beladenen *A. castellanii* nachgewiesen werden (Weber et al., 2014). Da das homologe Protein LpC_3106 (Tyrosin-Phosphatase) im Sekretom der *proA*-negativen Mutante von *L. pneumophila* Corby 1031,12-fach reduziert vorlag, wurde in diesem Versuch ein möglicher Einfluss von Phytat auf die Replikation von *L. pneumophila* Corby in *A. castellanii* untersucht. Dazu wurden die *A. castellanii*-Zellen zunächst mit schrittweise erhöhten Phytat-Konzentrationen kultiviert, bis diese am Ende bei 10 mM lag. Die Phytat-beladenen *A. castellanii* wurden mit einer MOI von 0,02 mit *L. pneumophila* Corby WT, *L. pneumophila* Corby $\Delta dotA$ und *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ infiziert. Nach 2 h, 24 h, 48 h und 72 h wurden Proben auf BCYE-Agar ausplattiert und nach 3-4 Tagen Inkubation bei 37 °C durch Auszählen der gewachsenen Kolonien die cfu/mL bestimmt (Abb. 5.24).

5 Ergebnisse

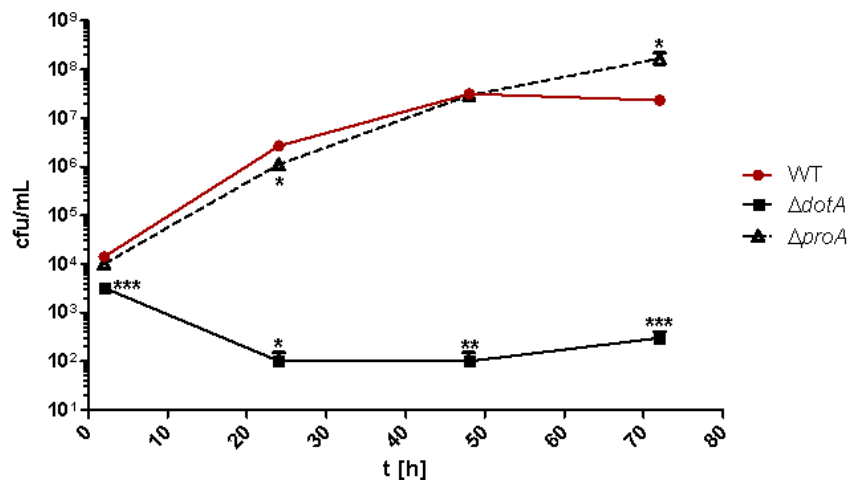


Abbildung 5.24: Infektion von *A. castellanii* in Anwesenheit von Phytat. *A. castellanii*-Zellen wurden mit schrittweise erhöhten Phytat-Konzentrationen inkubiert, bis diese bei 10 mM lag. Die Phytat-beladenen *A. castellanii* wurden mit *L. pneumophila* Corby WT (Kreis), *L. pneumophila* Corby $\Delta dotA$ (Quadrat) und *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ (Dreieck) mit einer MOI von 0,02 infiziert. Nach 2 h, 24 h, 48 h und 72 h wurde jeweils die cfu/mL bestimmt. Nach 24 h konnte für die *proA*-Deletionsmutante eine signifikant reduzierte cfu/mL nachgewiesen werden. Auch nach 72 h wurde für *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ eine Erhöhung der cfu/mL ermittelt, während die Zellzahl von *L. pneumophila* Corby WT konstant blieb. Der Effekt konnte jedoch nicht auf die Anwesenheit von Phytat zurückgeführt werden (siehe Kapitel 5.4.4). Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's *t*-Test ermittelt (* $p \leq 0,05$), ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$). \pm SEM: Standardfehler des Mittelwerts der Einzelwerte aus sechs unabhängigen Versuchen.

Die cfu/mL des Wildtyps betrug nach 2 h durchschnittlich $1,4 \times 10^3$, erhöhte sich nach 24 h auf $2,7 \times 10^4$ und nach 48 h auf $3,2 \times 10^6$. Dies entsprach einer Replikation um das 2286-fache. Nach 72 h sank die Zellzahl von *L. pneumophila* Corby WT auf $2,3 \times 10^6$. Für die replikationsgeschwächte *dotA*-Deletionsmutante wurde zu Beginn der Infektion (2 h) eine cfu/mL von $3,3 \times 10^2$ detektiert. Diese war somit, im Vergleich zum 2 h-Wert des Wildtyps um ein 4-faches signifikant reduziert. Nach 24 h sank die cfu/mL weiter auf $2,3 \times 10^0$. In der späten Phase der Infektion, nach 48 h und 72 h, konnten nur noch vereinzelt Kolonien ausgezählt werden. Für die *proA*-defiziente Mutante konnte zu Beginn der Infektion, nach 2 h, eine cfu/mL von $1,0 \times 10^3$ beobachtet werden. Im Gegensatz zu einer Infektion ohne Phytat-Zugabe war hier keine signifikante Differenz zum Wildtyp erkennbar (vergl. Kapitel 5.4.4). Nach 24 h war eine leichte Verzögerung der intrazellulären Replikation im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten. So lag die cfu/mL zu diesem Zeitpunkt für *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ bei ca. $1,1 \times 10^4$, bei *L. pneumophila* Corby WT dagegen bei ca. $3,0 \times 10^4$. Dieser Unterschied erwies sich als signifikant und konnte bei Infektion von *A. castellanii* ohne

Phytat nicht beobachtet werden (vergl. Kapitel 5.4.4). Nach 48 h lag die *cfu*/mL für beide Stämme bei ungefähr 3×10^6 . Erst nach 72 h Inkubation konnte eine signifikante Differenz in der intrazellulären Replikation zwischen der *proA*-negativen Mutante und dem Wildtyp ermittelt werden. So lag die *cfu*/mL für *L. pneumophila* Corby WT bei ca. 2×10^6 , die *cfu*/mL für *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ dagegen bei 2×10^7 . Die *proA*-negative Mutante konnte sich also nach 72 h weiterhin in *A. castellanii* vermehren, der Wildtyp jedoch nicht. In weiteren Infektionsversuchen mit der *proA*-defizienten Mutante stellte sich jedoch heraus, dass dieser Effekt nicht der Anwesenheit von Phytat zuzuschreiben war (siehe Kapitel 5.4.4). Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass die *proA*-Deletionsmutante, bei Anwesenheit von Phytat, nach 24 h eine signifikant verringerte Replikation in *A. castellanii* zeigt.

5.4 Phänotypische Charakterisierung von Protease-Deletionsmutanten

Laut MEROPS-Datenbank¹ für Peptidasen sind in *L. pneumophila* 38 Metallopeptidasen annotiert (Rawlings et al., 2016). Jedoch wurden bisher nur wenige von ihnen bereits untersucht. In den folgenden Unterkapiteln sollen daher nicht nur die weiteren Funktionen der Zink-Metalloprotease ProA, auf welcher das Hauptaugenmerk in dieser Arbeit liegt, aufgeklärt werden. Es werden weiterhin phänotypische Merkmale der Zink-Metallopeptidase LpC_0267 und der Aminopeptidase PepN in Bezug auf die Fortbewegung und ihrer Rolle bei der Infektion charakterisiert. Diese Peptidasen waren in den Sekretomen der *mip*-, bzw. der *proA*-defizienten Mutante akkumuliert, bzw. unterrepräsentiert (Rasch, 2016).

5.4.1 Erstellung einer *lpc_0267*-Deletionsmutante

Das hypothetische Protein LpC_0267 ist eine Zink-Metalloprotease und gliedert sich laut MEROPS-Datenbank für Peptidasen in die M20-Familie der Glutamat-Carboxypeptidasen ein (Rawlings et al., 2016). Hierbei handelt es sich üblicherweise um Exopeptidasen, die Glutamat am C-Terminus von Oligopeptiden hydrolysieren (Sherwood et al., 1985, Rowsell et al., 1997, Krause et al., 2002). Mit dem Programm SignalP

¹<http://merops.sanger.ac.uk>

5 Ergebnisse

konnte für LpC_0267 eine Signalsequenz vorhergesagt werden. Das Protein wurde bisher nicht charakterisiert. Jedoch konnte in früheren Studien beobachtet werden, dass LpC_0267 im Sekretom einer *mip*-Deletionsmutante von *L. pneumophila* Corby vermehrt vorliegt (Rasch, 2016). Um die Zink-Metalloprotease weiter zu untersuchen, wurde zunächst eine Deletionsmutante erstellt. Dafür wurde zunächst mit Hilfe der Primer 0267_UFF und 0267_UFR die 5'-flankierende Region (1980 bp) und mit den Primern 0267_DFF und 0267_DFR die 3'-flankierende Region (1500 bp) amplifiziert. In einer separaten PCR wurde weiterhin das *nptI*-Kanamycinresistenzgen (816 bp) mit den Primern NptI_Fa und NptI_R vervielfältigt (siehe Abb. 5.8 B). Durch eine Joining-PCR mit den Primern 0267_UFF und 0267_DFR wurden die *up*- und *downstream*-Konstrukte, die jeweils einen zur Kanamycinkassette komplementären Übergang aufwiesen, mit dem *nptI*-Gen verbunden.

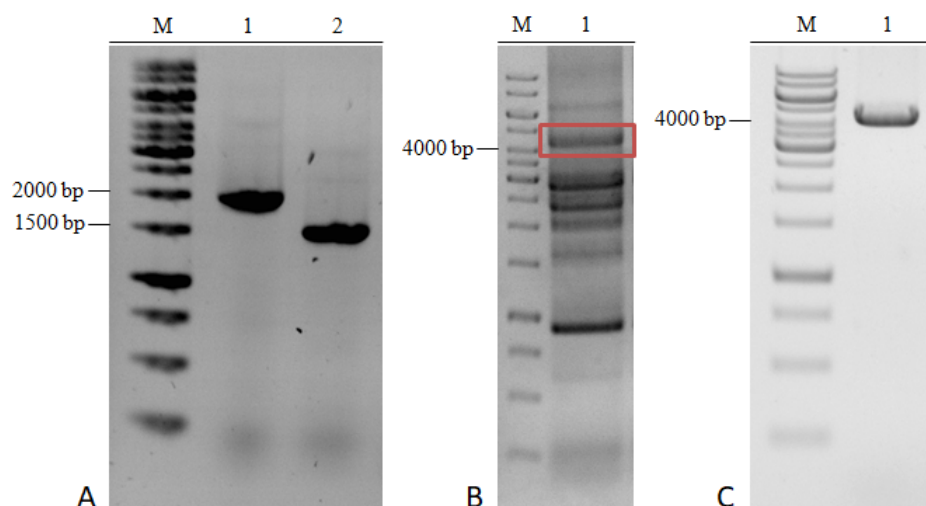


Abbildung 5.25: Agarosegelelektrophorese der *lpc_0267*-flankierenden Regionen, der Joining-PCR und des Deletionskonstrukts. (A) Amplifikation der 5'- und 3'-flankierenden Regionen des *lpc_0267*-Gens. Das Amplifikat der 5'-flankierende Region (1) lag bei einer Größe von 1980 bp, die 3'-flankierende Region (2) bei 1500 bp. (B) Erhaltene DNA-Banden nach der Joining-PCR. Das Deletionskonstrukt aus den *lpc_0267*-flankierenden Regionen und der Kanamycin-Resistenz-Kassette lag bei einer Gesamtgröße von 4249 bp (roter Kasten). Die entsprechende Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA isoliert. (C) Kolonie-PCR von *L. pneumophila* Corby Δlpc_0267 . Die Amplifikation der Zielsequenz aus dem Genom der Deletionsmutante ergab ein ca. 4300 bp großes Produkt. Dies entsprach der Größe des Deletionskonstrukts mit 4249 bp. Dargestellt sind die 1 %-igen Agarosegele nach der Färbung mit Ethidiumbromid. Als Marker wurde die 1 kb GeneRuler® DNA-Ladder von ThermoScientific verwendet.

Die Amplifikation der 5'- und 3'-flankierenden Regionen von *lpc_0267* war erfolgreich, da auf dem Ethidiumbromid-gefärbten 1 %-igen Agarosegel einzelne Banden

in Höhe der 2000 bp-, bzw. 1500 bp-Markerbande detektiert werden konnten (Abb. 5.25 A). Diese DNA-Banden entsprachen dem *upstream*-Fragment (1980 bp), bzw. dem *downstream*-Fragment (1500 bp). Das Gelbild der Joining-PCR zeigte verschiedene Banden auf unterschiedlichen Höhen (Abb. 5.25 B). Besonders stark ausgeprägt waren dabei DNA-Banden in Höhe der 1000 bp-, 2500 bp-, 3000 bp- und der 4000 bp-Markerbanden. Letztere wurde ausgeschnitten, da das Deletionskonstrukt eine Größe von 4249 bp aufweisen sollte. Nach der Isolierung der DNA aus dem Gel wurde das Konstrukt in den Vektor pGEM[®]-T Easy integriert. Nach Transformation von kompetenten *E. coli* DH10 β wurde das Plasmid aus einem positiven Klon reisoliert und für die Amplifikation des gesamten Deletionskonstruktes mit den Primern 0267_UFF und 0267_DFR verwendet. Das Amplifikat wurde für die Transformation von *L. pneumophila* Corby verwendet. Durch die natürliche Kompetenz der Legionellen wurde das DNA-Konstrukt aufgenommen und die Zielsequenz im Genom durch homologe Rekombination ersetzt. Der erhaltene *lpc_0267*-Deletionsstamm wurde anschließend mittels Kolonie-PCR (Abb. 5.25 C) und Sequenzierung (siehe Anhang) verifiziert.

5.4.2 Erstellung einer *pepN*-Deletionsmutante

Das Protein PepN ist eine der wichtigsten Aminopeptidasen in Bakterien und unter anderem für die Hydrolyse von N-terminalem Arginin, Lysin und Alanin zuständig (Addlagatta et al., 2006). In *E. coli* ist es an der Degradation von zytosolischen Proteinen beteiligt und spielt eine wichtige Rolle bei der zellulären Stressantwort (Chandu and Nandi, 2003). Bei manchen Bakterien scheint PepN auch einen Einfluss auf die Virulenz zu haben. So spielt es bei *Streptococcus pneumoniae* eine Rolle bei Lungeninfektionen (Hava and Camilli, 2002). Bei *Salmonella enterica* moduliert PepN die systemische Infektionen in Mäusen (Patil et al., 2007). Die Aminopeptidase N aus *L. pneumophila* wurde bisher nicht näher charakterisiert. In den zuvor aufgeführten Sekretomstudien dieser Arbeit konnte für die *proA*-negative Mutante eine 32-fache Reduktion von PepN im Überstand im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden (vergleiche Tabelle 5.2). Um die Aminopeptidase weiter zu untersuchen, wurde im Rahmen einer Bachelorarbeit von Hendrik Schürer (2015) eine *pepN*-Deletionsmutante in *L. pneumophila* Corby erstellt. Da die zuvor bei *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ und *L. pneumophila* Corby Δlpc_0267 verwendete Methode (siehe Kapitel 4.7.4) diesmal nicht erfolgreich war, wurde das Deletionskonstrukt durch Einfügen von Restriktionsschnittstellen erzeugt. Dafür wurde zunächst des *pepN*-Gen zusammen mit den flankie-

5 Ergebnisse

renden Regionen mit den Primern 3095_UFF und 3095_DFR amplifiziert, das Amplifikat in den Vektor pGEM[®]-T Easy eingebracht und *E. coli* DH10 β damit transformiert. Aus einem positiven Klon wurde das Plasmid reisoliert und das *pepN*-Gen mittels inverser PCR mit den Primern 3095_Bam_F und 3095_Kpn_R entfernt. Gleichzeitig wurden Restriktionsschnittstellen für BamHI und KpnI eingefügt. Das Gentamicin-Resistenzgen *aacC1* wurde ebenfalls mit diesen Schnittstellen amplifiziert, sodass es, nach einem Restriktionsverdau, einfach in den linearen pGEM[®]-T Easy-Vektor mit den *pepN*-flankierenden Regionen ligiert werden konnte. Nach Transformation kompetenter *E. coli* DH10 β wurde das Plasmid aus einem positiven Klon reisoliert und das Deletionskonstrukt mittels PCR vervielfältigt und durch homologe Rekombination in das *L. pneumophila* Corby-Genom eingebracht.

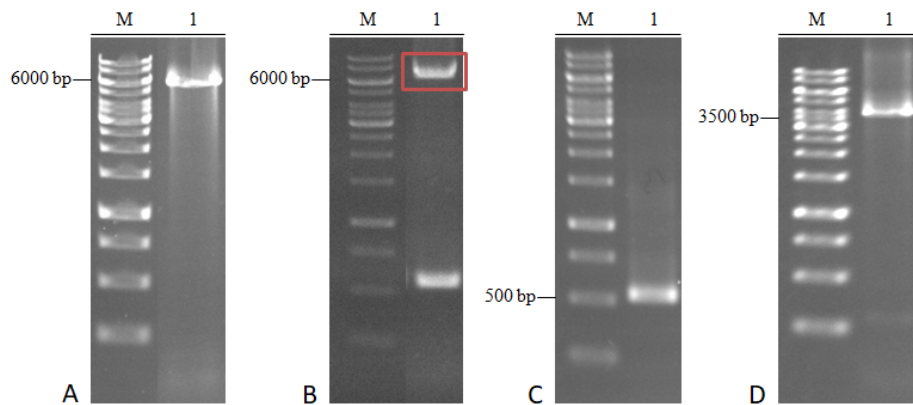


Abbildung 5.26: Agarosegelelektrophorese von *pepN* mit flankierenden Regionen, der inversen PCR, der Gentamicinkassette und des Deletionskonstrukts. (A) Amplifikation des *pepN*-Gens sowie der 5'- und 3'-flankierenden Regionen. Das Amplifikat lag bei einer Höhe von 5925 bp. (B) Erhaltenen DNA-Banden nach der inversen PCR von pGEM[®]-T Easy-*pepN*. Die obere Bande enthielt das gewünschte Konstrukt (roter Kasten) und lag bei 6348 bp und wurde aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA isoliert. (C) Amplifikation von *aacC1*. Das Amplifikat lag bei einer Höhe von 534 bp. (D) Agarosegel des Deletionskonstrukts nach Einfügen der Gentamicin-Kassette. Das Konstrukt hatte die gewünschte Größe von 3842 bp. Dargestellt sind die 1 %-igen Agarosegele nach der Färbung mit Ethidiumbromid. Als Marker wurde die 1 kb GeneRuler[®] DNA-Ladder von ThermoScientific verwendet.

Die Amplifikation des *pepN*-Gens inklusive der 5'- und 3'-flankierenden Regionen war erfolgreich, da auf dem mit Ethidiumbromid gefärbten 1 %-igen Agarosegel eine einzelne Bande bei ca. 6000 bp zu erkennen war (Abb. 5.26 A). Diese entsprach der vorhergesagten Produktgröße von 5925 bp. Das Gelbild nach der inversen PCR von pGEM[®]-T Easy-*pepN* zeigte zwei verschiedene Banden, die jeweils in Höhe der 500 bp- und knapp oberhalb der 6000 bp-Markerbanden zu finden waren. Da das gewünschte Produkt, bestehend aus dem linearen pGEM[®]-T Easy und den *pepN*-

flankierenden Sequenzen, eine vorhergesagte Größe von 6348 bp hatte, wurde die obere Bande aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA isoliert (Abb. 5.26 B). Nachdem auch das Gentamicin-Resistenzgen (534 bp) erfolgreich amplifiziert werden konnte (Abb. 5.26 C), wurde nach Ligation mit dem linearen pGEM[®]-T Easy-Vektor mit den *pepN*-flankierenden Regionen und Transformation kompetenter *E. coli* DH10 β das Plasmid aus einem positiven Klon reisoliert und das Deletionskonstrukt mittels PCR vervielfältigt (Abb. 5.26 D). Das Konstrukt hatte dabei die gewünschte Größe von 3842 bp und wurde für die Transformation von *L. pneumophila* Corby verwendet. Der erhaltene *pepN*-Deletionsstamm wurde anschließend mittels Kolonie-PCR und Sequenzierung verifiziert (siehe Anhang).

5.4.3 ProA und PepN beeinflussen die *Sliding Motility* von *L. pneumophila*

Sliding Motility ist eine besondere Form der bakteriellen Oberflächentranslokation, die unabhängig von Flagellen oder Pili ist. Dabei schleust das Bakterium Tenside aus, die auf glatten Oberflächen einen Film ausbilden und somit durch Reduktion der Oberflächenspannung eine Ausbreitung von Bakterien bewirken. Bei *L. pneumophila* sind bei dieser Form der Fortbewegung das T1SS und das T2SS beteiligt (Murray and Kazmierczak, 2008, Stewart et al., 2009, 2011). In dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob die Proteaseaktivität verschiedener *L. pneumophila*-Proteasen im Zusammenhang mit der *Sliding Motility* steht. Diese Versuche wurden zum Teil in Zusammenarbeit mit Hendrik Schürer (2015) durchgeführt. Dazu wurden je 10 μ L einer stationären Kultur von *L. pneumophila* Corby WT, *L. pneumophila* Corby Δ *proA*, *L. pneumophila* Corby Δ *lpc_0267* und *L. pneumophila* Corby Δ *pepN* auf BCYE-Platten mit 0,5 % Agar-Anteil aufgetropft und bis zu 21 d bei 30 °C inkubiert. Nach 7 d, 14 d und 21 d wurden die Platten photographisch dokumentiert und die Flächen von Kolonie und Tensidfilm durch die Bestimmung der Pixel im Verhältnis zur Fläche der Agarplatte quantifiziert. Für die Auswertung wurden die Daten aus vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, mindestens in Dreifachbestimmung, herangezogen (Abb. 5.27).

Rein visuell ließen sich dabei keine Unterschiede in der Kolonieform und -größe zwischen *L. pneumophila* Corby WT, *L. pneumophila* Corby Δ *proA* und *L. pneumophila* Corby Δ *lpc_0267* feststellen (Abb. 5.27 A). Auch die Quantifizierung der Kolonief Flächen ergab keine signifikanten Unterschiede der genannten Stämme untereinander

5 Ergebnisse

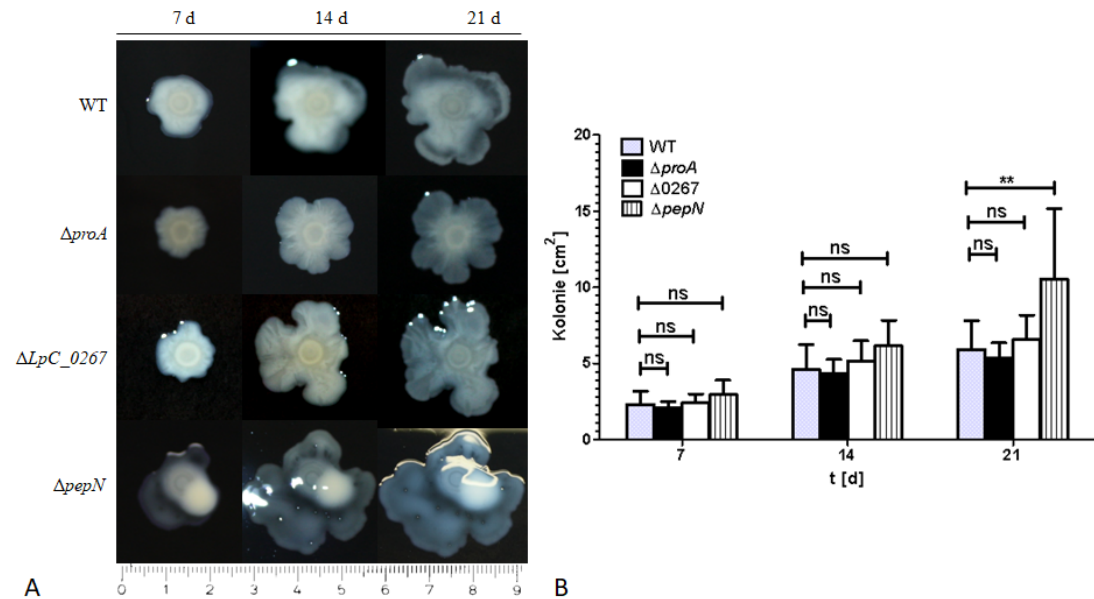


Abbildung 5.27: Koloniausbreitung durch Sliding Motility bei Proteasemutanten von *L. pneumophila*. Stationäre Kulturen von *L. pneumophila* Corby WT, *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$, *L. pneumophila* Corby Δlpc_0267 und *L. pneumophila* Corby $\Delta pepN$ wurden auf BCYE-Platten mit 0,5 % Agar-Anteil aufgetropft und bis zu 21 d bei 30 °C inkubiert. (A) Die Platten wurden nach 7 d, 14 d und 21 d photographisch dokumentiert. (B) Die Flächen der Kolonien wurden anschließend quantifiziert und miteinander verglichen. Die *pepN*-negative Mutante zeigte nach 21 d eine signifikant vergrößerte Koloniefäche im Vergleich zum Wildtyp. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's *t*-Test ermittelt (** $p \leq 0,01$), \pm SD.

(Abb. 5.27 B). Nach 7 d Inkubation wiesen die Kolonien des Wildtyps und der Proteasemutanten *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ und *L. pneumophila* Corby Δlpc_0267 Flächen zwischen 2,0 cm^2 und 2,4 cm^2 auf. Die Koloniefäche des Wildtyps erhöhte sich nach 14 d Inkubation auf durchschnittlich 4,6 cm^2 , was einer Zunahme von 50 % gegenüber dem 7 d-Wert entsprach. Nach 21 d Inkubation betrug die durchschnittliche Fläche der Kolonien 5,9 cm^2 und steigerte sich dementsprechend um 26 % gegenüber dem 14 d-Wert. Die Gesamtzunahme der Koloniefäche des Wildtyps zwischen 7 d und 21 d lag somit bei 3,6 cm^2 , bzw. 61 %. Die *proA*-defiziente Mutante erreichte ähnliche Werte wie der Wildtyp. Nach 14 d Inkubation betrug die durchschnittliche Koloniefäche 4,3 cm^2 und erhöhte sich demnach, seit dem 7 d-Wert, um 51 %. Die Fläche der Kolonie steigerte sich nach 21 d auf durchschnittlich 5,4 cm^2 , was einem Zuwachs von weiteren 27 % nach dem 14 d-Wert entsprach. Insgesamt erhöhte sich damit die Koloniefäche von *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ zwischen 7 d und 21 d um 3,3 cm^2 , bzw. 61 %. Die Ausbreitung der Kolonie bei der Sliding Motility der *proA*-defizienten Mutante war damit nahezu identisch zum Wildtyp. Auch die *lpc_0267*-negative Mutante

zeigte ein mit dem Wildtyp vergleichbares Verhalten. Nach 14 d Inkubation lag die durchschnittliche Koloniefläche bei $5,2 \text{ cm}^2$. Dies entsprach einer Steigerung um 54 % im Vergleich zum 7 d-Wert. Nach 21 d konnte eine durchschnittliche Koloniefläche von $6,6 \text{ cm}^2$ beobachtet werden, was einer Erhöhung um 21 % entsprach. Demnach lag die Gesamtzunahme der Koloniefläche von *L. pneumophila* Corby Δlpc_0267 zwischen 7 d und 21 d bei $4,2 \text{ cm}^2$, bzw. 64 %. Somit konnte auch für die *lpc_0267*-defiziente Mutante kein Unterschied in der Koloniausbreitung bei der *Sliding Motility* im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. Im Gegensatz dazu konnte für *L. pneumophila* Corby $\Delta pepN$ eine erhöhte Koloniausbreitung nachgewiesen werden. Nach 7 d Inkubation lag die durchschnittliche Koloniefläche schon bei $2,9 \text{ cm}^2$ und war somit 21 % größer als die Fläche der Wildtyp-Kolonien. Sie erhöhte sich nach 14 d Inkubation auf durchschnittlich $6,1 \text{ cm}^2$, was einer Zunahme von 52 % entsprach. Der Unterschied zum Wildtyp lag bei diesem Zeitpunkt bei $1,5 \text{ cm}^2$, bzw. 25 %. Nach 21 d Inkubation erreichten die *L. pneumophila* Corby $\Delta pepN$ -Kolonien eine durchschnittliche Fläche von $10,5 \text{ cm}^2$. Somit war eine Erhöhung von $4,4 \text{ cm}^2$, bzw. 42 % zu beobachten. Die Flächen der Kolonien waren zu diesem Zeitpunkt also $4,6 \text{ cm}^2$, bzw. 44 % größer. Dieser Versuch zeigte also, dass die Koloniausbreitung bei der *Sliding Motility* bei *L. pneumophila* Corby $\Delta pepN$ nach 21 d Inkubation im Vergleich zu *L. pneumophila* Corby WT signifikant erhöht war. Weiterhin wurden auch die Flächen der Tensidfilme berechnet und miteinander verglichen (Abb. 5.28).

Bereits visuell zeigte sich ein Unterschied in der Tensidfilmfläche der *proA*-defizienten Mutante, die im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert vorlag (Abb. 5.28 A). Bei den Tensidfilmen von *L. pneumophila* Corby Δlpc_0267 und *L. pneumophila* Corby $\Delta pepN$ konnten optisch keine Differenzen zum Wildtyp detektiert werden. Diese Beobachtungen konnten durch Quantifizierung der Tensidfilmflächen bestätigt werden (Abb. 5.28 B). Beim Wildtyp lag die Fläche des Tensidfilms nach 7 d Inkubation bei durchschnittlich $12,2 \text{ cm}^2$. Nach 14 d lag diese bei $27,4 \text{ cm}^2$, was einer Erhöhung von 55,5 % entsprach. Die Tensidfilmfläche vergrößerte sich nach 21 d Inkubation auf durchschnittlich $35,8 \text{ cm}^2$ und nahm somit um 23,5 % zu. Dies entsprach einer Gesamtvergrößerung von $23,6 \text{ cm}^2$, bzw. 65,9 % zwischen 7 d und 21 d. Die Fläche des Tensidfilms der *proA*-defizienten Mutante betrug nach 7 d durchschnittlich $11,5 \text{ cm}^2$. Nach 14 d Inkubation lag diese bei $18,9 \text{ cm}^2$, was einer Erhöhung von 39,2 % entsprach. Somit lag die Tensidfilmfläche der *proA*-defizienten Mutante um $8,5 \text{ cm}^2$, bzw. 31 % verringert im Vergleich zum Wildtyp zu diesem Zeitpunkt vor. Nach 21 d er-

5 Ergebnisse

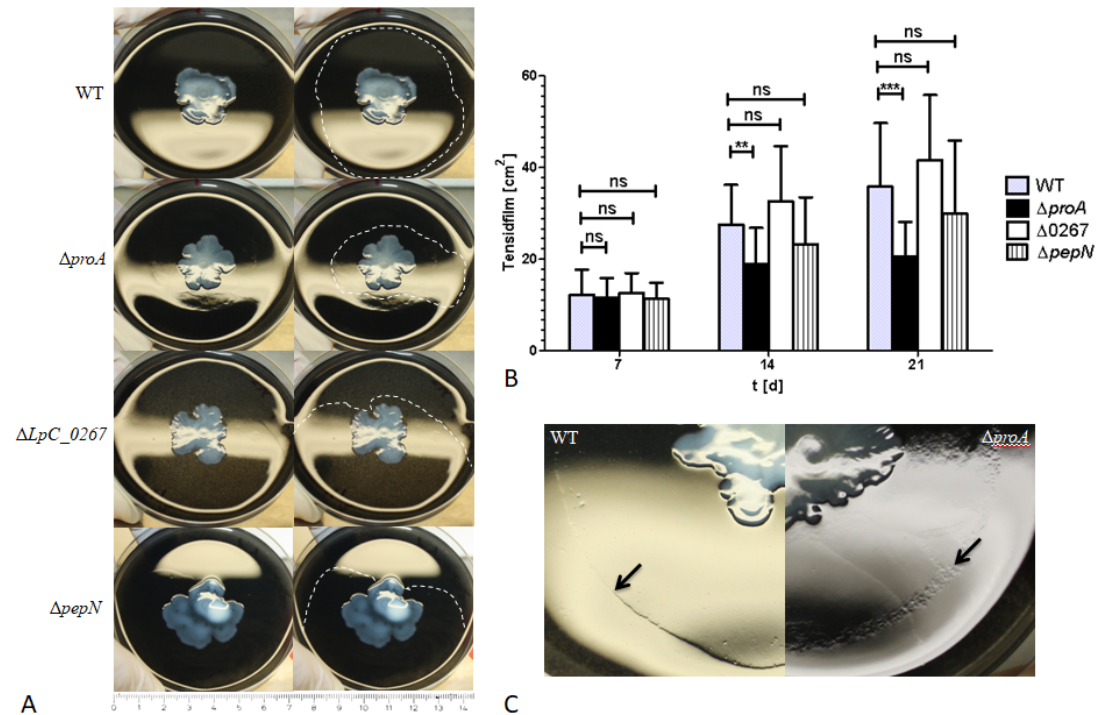


Abbildung 5.28: Ausbreitung des Tensidfilms bei Proteasemutanten von *L. pneumophila*. Stationäre Kulturen von *L. pneumophila* Corby WT, *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$, *L. pneumophila* Corby Δlpc_0267 und *L. pneumophila* Corby $\Delta pepN$ wurden auf BCYE-Platten mit 0,5 % Agar-Anteil aufgetropft und bis zu 21 d bei 30 °C inkubiert. (A) Die Platten wurden nach 7 d, 14 d und 21 d photographisch dokumentiert. Dargestellt sind hier die Kolonien und Tensidfilme nach 21 d. Die weiße Umrandung markiert den Rand des jeweiligen Tensidfilms. (B) Die Flächen der Tensidfilme wurden anschließend quantifiziert und miteinander verglichen. Die *proA*-negative Mutante zeigte nach 14 d und 21 d eine signifikant verringerte Tensidfilmfläche im Vergleich zum Wildtyp. (C) Der Tensidfilm von *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ zeigte nach 21 d eine deutlich andere Struktur im Vergleich zu *L. pneumophila* Corby WT. Der Rand des jeweiligen Tensidfilms ist mit einem schwarzen Pfeil markiert. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's *t*-Test ermittelt (** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$), \pm SD: Standardabweichung der Einzelwerte aus vier unabhängigen Experimenten.

reichte der Tensidfilm von *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ eine Fläche von 20,5 cm^2 . Demnach vergrößerte sich dieser im Vergleich zum 14 d-Wert um nur 7,8 %. Verglichen mit dem Wildtyp lag die Fläche um 15,3 cm^2 , bzw. 57,3 % verringert vor. Dies zeigte, dass die *proA*-negative Mutante signifikant weniger Tenside ausschleust, als der Wildtyp. Bei *L. pneumophila* Corby Δlpc_0267 betrug die Fläche des Tensidfilms nach 7 d durchschnittlich 12,6 cm^2 und erhöhte sich nach 14 d auf 32,6 cm^2 um 61,3 %. Damit war die Fläche nach 14 d um 5,2 cm^2 , bzw. 16 % größer als die des Wildtyps. Jedoch war diese Differenz nicht signifikant. Nach 21 d erreichte der Tensidfilm eine Fläche von 41,7 cm^2 und vergrößerte sich demnach um 21,8 %. Somit lag dieser um 5,9 cm^2 , bzw. 14,1 % vergrößert im Vergleich zum Wildtyp vor. Durch die ho-

hen Standardabweichungen war der Unterschied jedoch auch hier nicht signifikant. Bei *L. pneumophila* Corby $\Delta pepN$ betrug die Fläche des Tensidfilms nach 7 d Inkubation durchschnittlich 11,3 cm² und erhöhte sich nach 14 d auf 23,2 cm², was einer Vergrößerung um 48,7 % entsprach. Im Vergleich zum Wildtyp war die Fläche um 4,2 cm², bzw. 15,3 % reduziert. Jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant. Nach 21 d Inkubation erreichte der Tensidfilm der *pepN*-defizienten Mutante eine Fläche von 29,9 cm² und erhöhte sich somit seit dem 14 d-Wert um 22,4 %. Die Fläche des Wildtyp-Tensidfilms war damit um 5,9 cm², bzw. 16,5 % höher. Jedoch konnte auch hier kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Dieser Versuch zeigte also, dass der Tensidfilm der *proA*-defizienten Mutante signifikant reduziert ist im Vergleich zum Wildtyp. Dabei konnten auch Unterschiede in der Struktur des Tensidfilms beobachtet werden (Abb. 5.28 C). Beim Wildtyp wies dieser eine eher glatte Struktur mit einer klaren Abgrenzung zum BCYE-Agar hin auf. Bei *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ war dagegen kein klarer Rand erkennbar. Auch war der Tensidfilm oft ungleichmäßig und unterbrochen. Diese Ergebnisse deuten auf eine Rolle von ProA bei der Zusammensetzung des Tensidfilms hin. Bei *L. pneumophila* Corby $\Delta pepN$ konnte zwar eine stärkere Ausbreitung der Kolonie festgestellt werden, jedoch hatte das Fehlen der Aminopeptidase keine Auswirkungen auf die Größe des Tensidfilms.

5.4.4 ProA beeinflusst die intrazelluläre Replikation in *A. castellanii* in der frühen Vermehrungsphase

In früheren Versuchen mit *proA*-negativen Mutanten von *L. pneumophila* konnte bisher kein Einfluss der Zink-Metalloprotease auf die intrazelluläre Replikation von *A. castellanii* nachgewiesen werden (Hales and Shuman, 1999a, Rossier et al., 2008). Nach Erstellung einer neuen *proA*-Deletionsmutante in *L. pneumophila* Corby sollten diese Ergebnisse in dieser Arbeit bestätigt werden. Weiterhin sollten die bis dato unerforschten Proteasen LpC_0267 und PepN auf einen möglichen Einfluss auf die intrazelluläre Vermehrung in Acanthamoeben untersucht werden. Dafür wurden *A. castellanii*-Zellen mit *L. pneumophila* Corby WT, *L. pneumophila* Corby $\Delta dotA$, *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$, *L. pneumophila* Corby Δlpc_0267 und *L. pneumophila* Corby $\Delta pepN$ mit einer MOI von 0,02 infiziert. Nach 2 h, 24 h, 48 h und 72 h wurde die jeweilige cfu/mL durch Ausplattieren auf BCYE-Agarplatten und Auszählen der gewachsenen Kolonien ermittelt (Abb. 5.29).

5 Ergebnisse

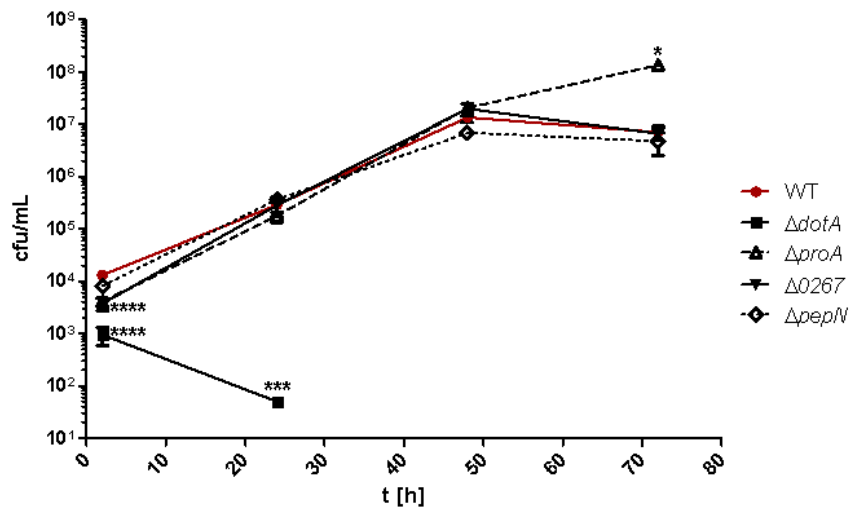


Abbildung 5.29: Intrazelluläre Replikation verschiedener *L. pneumophila* Corby Proteasemutanten in *A. castellanii*. *A. castellanii*-Zellen wurden mit *L. pneumophila* Corby WT (Kreis, rot), *L. pneumophila* Corby $\Delta dotA$ (Viereck), *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ (Dreieck offen), *L. pneumophila* Corby Δlpc_{0267} (Dreieck geschlossen) und *L. pneumophila* Corby $\Delta pepN$ (Raute) mit einer MOI von 0,02 infiziert. Nach 2 h, 24 h, 48 h und 72 h wurde jeweils die cfu/mL bestimmt. Die *proA*-defiziente Mutante zeigte dabei im Vergleich zum Wildtyp eine signifikant verringerte cfu/mL nach 2 h sowie eine signifikant erhöhte cfu/mL nach 72 h. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's *t*-Test ermittelt (* $p \leq 0,05$, **** $p \leq 0,0001$), \pm SEM: Standardfehler des Mittelwerts der Einzelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Zu Beginn der Infektion (2 h) lagen die cfu/mL des Wildtyps bei $1,3 \times 10^4$. Nach 24 h erhöhte sich der cfu-Wert auf durchschnittlich $2,9 \times 10^5$ /mL und nach 48 h auf $1,4 \times 10^7$ /mL. Dies entsprach einer Vermehrung um das 22-, bzw. 1077-fache im Vergleich zum 2 h-Wert. In der späteren Phase der Infektion, nach 72 h, reduzierte sich der cfu-Wert von *L. pneumophila* Corby WT auf durchschnittlich $7,1 \times 10^6$ /mL. Für die Negativ-Kontrolle *L. pneumophila* Corby $\Delta dotA$ konnte nach 2 h eine cfu/mL von 1×10^2 beobachtet werden. Dies entsprach einem um das 130-fach reduzierten cfu-Wert im Vergleich zum 2 h-Wert des Wildtyps. Nach 24 h konnte für die *dotA*-defiziente Mutante nur noch eine cfu/mL von durchschnittlich $1,7 \times 10^1$ nachgewiesen werden. Nach 48 h, bzw. 72 h konnten auf den BCYE-Agarplatten keine Kolonien mehr ausgezählt werden. Die *proA*-negative Mutante wies zu Beginn der Infektion einen cfu-Wert von $4,0 \times 10^3$ /mL auf und lag somit um das 3,3-fache signifikant reduziert im Vergleich zu *L. pneumophila* Corby WT vor. Nach 24 h lag die cfu/mL von *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ bei durchschnittlich $1,8 \times 10^5$ und nach 48 h bei $2,1 \times 10^7$ vor. Somit lagen hierbei keine signifikanten Unterschiede zur Replikation des

Wildtyps vor. In der späten Phase der Infektion konnte für die *proA*-Deletionsmutante ein *cfu*-Wert von durchschnittlich $1,4 \times 10^8/\text{mL}$ detektiert werden. Damit lag dieser signifikant um ein 20-faches höher als beim Wildtyp. Die *lpc_0267*-defiziente Mutante zeigte nach 2 h eine durchschnittliche *cfu*/mL von $3,1 \times 10^3$, nach 24 h von $2,3 \times 10^5$ und nach 48 h von $1,6 \times 10^7$. Nach 72 h reduzierte sich diese auf $6,7 \times 10^6$ *cfu*/mL. Somit konnten keine signifikanten Unterschiede zum Infektionsverlauf des Wildtyps festgestellt werden. Ähnliche Ergebnisse lieferte die Infektion mit *L. pneumophila* Corby $\Delta pepN$. Zu Beginn der Infektion lag die durchschnittliche *cfu*/mL bei $8,1 \times 10^3$. Nach 24 h erhöhte sich der *cfu*-Wert auf $3,6 \times 10^5$ und nach 48 h auf $6,9 \times 10^6$. In der späten Phase der Infektion (72 h) wurde ein *cfu*-Wert von $4,8 \times 10^6$ beobachtet. Somit konnte auch für die *pepN*-Deletionsmutante kein Unterschied in der Replikation im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. Insgesamt zeigten diese Ergebnisse, dass ProA in der frühen (2 h) und der späten Phase (72 h) einen Einfluss auf die Infektion von *A. castellanii* hat. Dabei scheint die höhere *cfu*/mL von *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ im Vergleich zum Wildtyp nach 72 h jedoch nicht mit der Replikation zusammenzuhängen. Mögliche Ursachen könnten eine Wirtslimitierung beim Wildtyp oder andere Sekundäreffekte sein (siehe Diskussion in Abschnitt 6.4).

5.4.5 ProA beeinflusst die intrazelluläre Replikation in *V. vermiformis* in der frühen Vermehrungsphase

Im Gegensatz zur Infektion von *A. castellanii* konnten Rossier et al. 2008 eine verminderte Replikationsfähigkeit für eine *proA*-negative Mutante in *V. vermiformis* nachweisen. In dieser Arbeit sollten diese Ergebnisse mit einer neu erstellten *proA*-Deletionsmutante verifiziert sowie ein möglicher Einfluss der Peptidasen LpC_0267 und PepN auf die Replikation in *V. vermiformis* untersucht werden. Dafür wurden *V. vermiformis*-Zellen mit *L. pneumophila* Corby WT, *L. pneumophila* Corby $\Delta dotA$, *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$, *L. pneumophila* Corby Δlpc_0267 und *L. pneumophila* Corby $\Delta pepN$ mit einer MOI von 0,02 infiziert. Nach 2 h, 24 h, 48 h und 72 h wurde die *cfu*/mL durch Ausplattieren auf BCYE-Agarplatten und Auszählen der gewachsenen Kolonien bestimmt (Abb. 5.30).

Nach 2 h konnte für den Wildtyp eine durchschnittliche *cfu*/mL von $1,0 \times 10^4$ ermittelt werden. Der *cfu*-Wert erhöhte sich nach 24 h auf $1,7 \times 10^5/\text{mL}$, was ein 17-faches des 2 h-Wertes entsprach. Nach 48 h lag die *cfu*/mL bei durchschnittlich $9,8 \times 10^6$

5 Ergebnisse

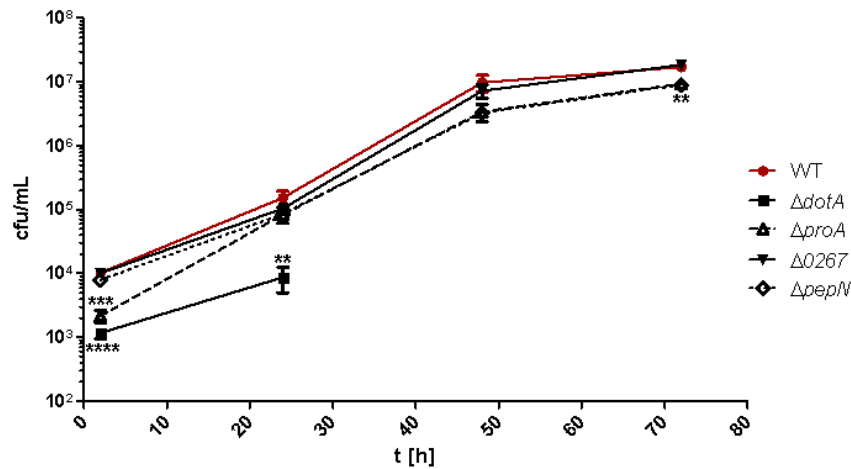


Abbildung 5.30: Intrazelluläre Replikation verschiedener *L. pneumophila* Corby Proteasemutanten in *V. vermiformis*. *V. vermiformis*-Zellen wurden mit *L. pneumophila* Corby WT (Kreis, rot), *L. pneumophila* Corby $\Delta dotA$ (Viereck), *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ (Dreieck offen), *L. pneumophila* Corby Δlpc_{0267} (Dreieck geschlossen) und *L. pneumophila* Corby $\Delta pepN$ (Raute) mit einer MOI von 0,02 infiziert. Nach 2 h, 24 h, 48 h und 72 h wurde jeweils die cfu/mL bestimmt. Die *proA*-defiziente Mutante zeigte dabei im Vergleich zum Wildtyp eine signifikant verringerte cfu/mL nach 2 h sowie eine signifikant reduzierte cfu/mL nach 72 h. Auch für die *pepN*-Deletionsmutante konnte nach 72 h eine signifikant verminderte cfu/mL nachgewiesen werden. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's *t*-Test ermittelt (** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$), \pm SEM: Standardfehler des Mittelwerts der Einzelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

und war somit 980-fach erhöht im Vergleich zum 2 h-Wert. In der späten Phase der Infektion erhöhte sich der cfu-Wert weiter auf $1,7 \times 10^7$. Demnach erreichte der Wildtyp nach 72 h ein 1700-fache des 2 h-Wertes. Für die replikationsgeschwächte *dotA*-Deletionsmutante konnte nach 2 h ein cfu-Wert von $1,2 \times 10^3$ ermittelt werden. Damit zeigte die Negativ-Kontrolle bereits nach 2 h eine im Vergleich zum Wildtyp signifikant um ein 8,3-faches reduzierte cfu/mL. Nach 24 h erhöhte sich die Zahl der koloniebildenden Einheiten pro mL zwar um ein 5-faches auf $5,8 \times 10^3$, blieb jedoch immer noch signifikant reduziert im Vergleich zum 24 h-Wert des Wildtyps. In den späten Phasen der Infektion, nach 48 h und 72 h, waren für die *dotA*-negative Mutante keine Kolonien mehr auf den Agar-Platten nachzuweisen. Bei *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ lag die cfu/mL nach 2 h bei durchschnittlich $2,2 \times 10^3$ und damit um ein 5-faches signifikant reduziert im Vergleich zum 2 h-Wert des Wildtyps. Nach 24 h erhöhte sich der cfu-Wert auf $8,3 \times 10^4$ und nach 48 h auf $3,4 \times 10^6$. Ein signifikanter Unterschied zu den entsprechenden Werten von *L. pneumophila* Corby WT war dabei nicht festzustellen. Der 72 h-Wert von *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ lag bei durchschnittlich $9,4 \times 10^6$ cfu/mL und war somit signifikant um ein 2-faches reduziert. Bei

L. pneumophila Corby Δlpc_0267 lag die *cfu*/mL zu Beginn der Infektion nach 2 h bei $1,0 \times 10^4$, erhöhte sich nach 24 h auf $1,0 \times 10^4$ und nach 48 h auf $7,3 \times 10^6$. In der späten Phase der Infektion, nach 72 h, konnte ein *cfu*-Wert von $1,9 \times 10^7$ beobachtet werden. Signifikanten Unterschiede zum Wildtyp wurden dabei nicht festgestellt. Die Deletionsmutante der Aminopeptidase PepN zeigte nach 2 h eine *cfu*/mL von $7,9 \times 10^3$, welche sich nach 24 h auf $8,6 \times 10^4$ *cfu*/mL und nach 48 h auf $3,3 \times 10^6$ *cfu*/mL erhöhte. Zunächst waren dabei keine signifikanten Unterschiede zu den entsprechenden *cfu*-Werten des Wildtyps erkennbar. Nach 72 h lag die *cfu*/mL von *L. pneumophila* Corby $\Delta pepN$ bei $9,0 \times 10^6$ und war damit (ähnlich wie bei *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$) signifikant um ein 2-faches reduziert. Zusammenfassend ließen sich mit diesem Versuch ein Einfluss von ProA auf die frühe Phase sowie von ProA und PepN auf die späte Phase der Infektion (72 h) in *V. vermiformis* nachweisen. Vermutlich sind die im Vergleich zum Wildtyp geringeren *cfu*/mL von *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ und *L. pneumophila* Corby $\Delta pepN$ nach 72 h zu diesem Zeitpunkt der Infektion weniger auf die Replikation zurückzuführen, da nur noch eine geringe Vermehrung des Wildtyps erfolgte. Mögliche Ursachen könnten auch eine Wirtslimitierung beim Wildtyp oder andere Sekundäreffekte sein (siehe Diskussion in Abschnitt 6.4).

5.4.6 ProA beeinflusst die intrazelluläre Replikation in THP-1-Makrophagen

Infektionsversuche von *proA*-negativen Mutanten mit Meerschweinchen- sowie humanen U937- und HL60-Makrophagen führten bisher zu kontroversen Ergebnissen (Sze-to and Shuman, 1990, Moffat et al., 1994b, Edelstein et al., 1999). Um die Rolle von ProA sowie der Proteasen LpC_0267 und PepN in der Infektion von humanen Makrophagen zu klären, wurden Versuche mit der Makrophagen-ähnlichen Zelllinie THP-1 durchgeführt. Dazu wurden die THP-1-Zellen mit einer MOI 1 mit *L. pneumophila* Corby WT, *L. pneumophila* Corby $\Delta dotA$, *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$, *L. pneumophila* Corby Δlpc_0267 und *L. pneumophila* Corby $\Delta pepN$ infiziert und nach 2 h, 24 h und 48 h zur Bestimmung der *cfu*/mL auf BCYE-Platten ausplattiert (Abb. 5.31). Die *cfu*/mL des Wildtyps lag nach 2 h bei durchschnittlich $3,0 \times 10^4$ und erhöhte sich nach 24 h auf $4,3 \times 10^5$, was einer Vermehrung um das 14-fache entsprach (Abb. 5.31 A). Nach 48 h betrug der *cfu*-Wert von *L. pneumophila* Corby WT durchschnittlich $4,0 \times 10^7$ /mL. Dies entsprach einer Vermehrung um das 1333-fache im Vergleich zum

5 Ergebnisse

2 h-Wert. Die replikationsgeschwächte *dotA*-Deletionsmutante wies zu Beginn der Infektion (2 h) eine *cfu*/mL von $3,1 \times 10^4$ auf und zeigte somit keine Differenzen zum 2 h-Wert des Wildtyps.

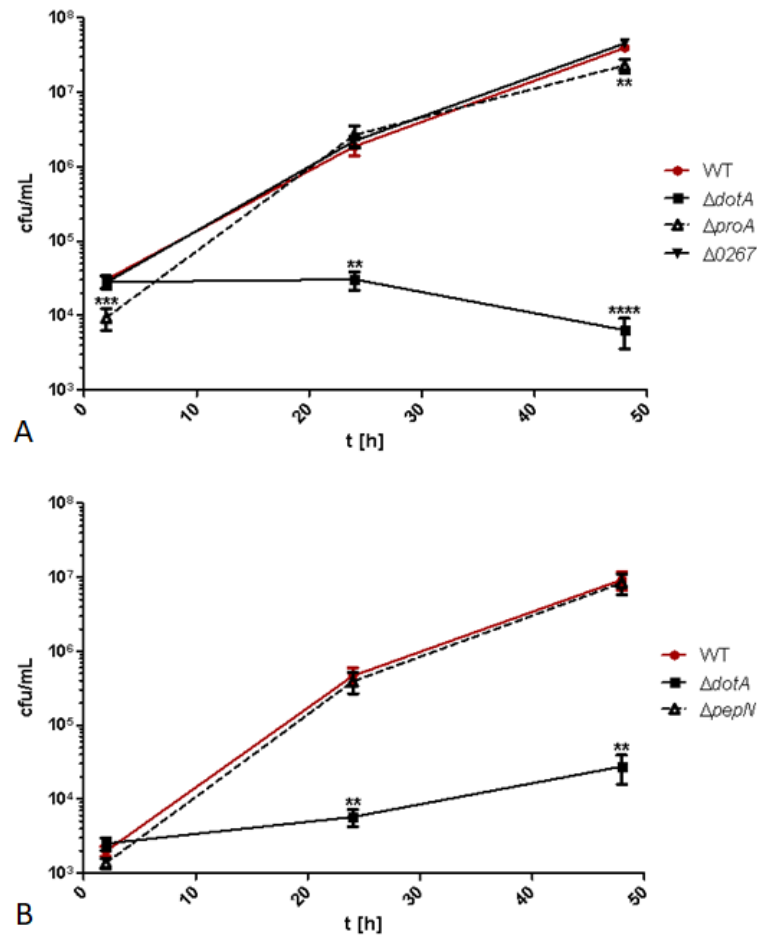


Abbildung 5.31: Intrazelluläre Replikation verschiedener *L. pneumophila* Corby Proteasemutanten in THP-1-Makrophagen. (A) THP-1-Zellen wurden mit *L. pneumophila* Corby WT (Kreis, rot), *L. pneumophila* Corby $\Delta dotA$ (Viereck), *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ (Dreieck offen) und *L. pneumophila* Corby Δlpc_{0267} (Dreieck geschlossen) mit einer MOI von 1 infiziert. Nach 2 h, 24 h und 48 h wurde jeweils die *cfu*/mL bestimmt. Die *proA*-defiziente Mutante zeigte dabei im Vergleich zum Wildtyp eine signifikant verringerte *cfu*/mL nach 2 h sowie nach 48 h. Für die *lpc_{0267}*-Deletionsmutante konnte dagegen kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp festgestellt werden. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's *t*-Test ermittelt (** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$), \pm SEM: Standardfehler des Mittelwerts der Einzelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

Nach 24 h erhöhte sich der *cfu*-Wert auf $3,5 \times 10^4$ /mL und war damit um ein 12-faches niedriger als der 24 h-Wert des Wildtyps. In der späten Phase der Infektion, nach 48 h, lag die *cfu*/mL von *L. pneumophila* Corby $\Delta dotA$ bei durchschnittlich $6,3 \times 10^3$ und sank somit um ein 5-faches verglichen mit dem 24 h-Wert. Im Vergleich zum Wildtyp

(nach 48 h) war dieser Wert 6349-fach signifikant reduziert. Die *proA*-defiziente Mutante zeigte nach 2 h einen *cfu*-Wert von $9,3 \times 10^3/\text{mL}$ und war somit, im Vergleich zum 2 h-Wert des Wildtyps, um ein 3-faches signifikant vermindert. Nach 24 h erhöhte sich die *cfu*/mL auf durchschnittlich $7,1 \times 10^5$. Jedoch lag hierbei keine Differenz zu *L. pneumophila* Corby WT vor. Ein signifikanter Unterschied war nach 48 h zu verzeichnen, wobei die *cfu*/mL der *proA*-Deletionsmutante mit $2,5 \times 10^7$ rund 2-fach niedriger ausfiel als beim Wildtyp. Bei *L. pneumophila* Corby Δlpc_0267 lag die *cfu*/mL zu Beginn der Infektion (2 h) bei durchschnittlich $3,2 \times 10^4$ und erhöhte sich nach 24 h auf $2,6 \times 10^6$. In der späten Phase der Infektion, nach 48 h, steigerte sich der *cfu*-Wert weiter auf $4,0 \times 10^7/\text{mL}$. Ein Unterschied in der Replikation zum Wildtyp konnte bei keinem der angegebenen Zeitpunkte festgestellt werden.

In Abbildung 5.31 B zeigte der Wildtyp nach 2 h eine durchschnittliche *cfu*/mL von $2,0 \times 10^3$, welche sich nach 24 h auf $4,6 \times 10^5$ *cfu*/mL erhöhte. Dies entsprach einer Vermehrung um das 233-fache im Vergleich zum 2 h-Wert. Nach 48 h lag der *cfu*-Wert bei durchschnittlich $9,2 \times 10^6/\text{mL}$, was einer nochmaligen Vermehrung um das 20-fache entsprach. Die Negativkontrolle *L. pneumophila* Corby $\Delta dotA$ wies nach 2 h eine *cfu*/mL von $2,5 \times 10^3$ auf und erhöhte sich nach 24 h leicht auf $5,8 \times 10^3$ *cfu*/mL. Damit war die *cfu*/mL im Vergleich zum 24 h-Wert des Wildtyps 79-fach signifikant reduziert. Nach 48 h lag der *cfu*-Wert bei $2,8 \times 10^5/\text{mL}$ und war somit, verglichen mit dem 48 h-Wert von *L. pneumophila* Corby WT, um ein 33-faches signifikant vermindert. Bei *L. pneumophila* Corby $\Delta pepN$ lag die durchschnittliche *cfu*/mL nach 2 h bei $1,4 \times 10^3$ und erhöhte sich nach 24 h auf $3,9 \times 10^5$ *cfu*/mL, bzw. nach 48 h auf $8,4 \times 10^6$ *cfu*/mL. Es lagen keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp vor. Insgesamt konnten in diesem Versuch ein Einfluss von ProA in der frühen Phase der Infektion (2 h) sowie auf die intrazelluläre Replikation nach 48 h festgestellt werden, wohingegen im Falle der Metalloproteasen LpC_0267 und PepN keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp auftraten.

5.4.7 ProA beeinflusst die intrazelluläre Replikation in HLTEs

In früheren Arbeiten wurde bereits festgestellt, dass die Zink-Metalloprotease ProA aus *L. pneumophila* eine massive Gewebsschädigung in Meerschweinchen-Lungen hervorruft (Conlan et al., 1986, Williams et al., 1987, Conlan et al., 1988b). Versu-

5 Ergebnisse

che mit *proA*-negativen Mutanten führten jedoch bisher zu kontroversen Ergebnissen (Blander et al., 1990, Moffat et al., 1994b). Um zu untersuchen, ob ProA sowie die Peptidasen LpC_0267 und PepN einen Einfluss auf die Vermehrung in HLTEs haben, wurde das Lungengewebe in kleine Stücke geschnitten in Lungenmedium mit *L. pneumophila* Corby WT, *L. pneumophila* Corby $\Delta dotA$, *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$, *L. pneumophila* Corby Δlpc_0267 und *L. pneumophila* Corby $\Delta pepN$ infiziert. Nach 2 h, 24 h und 48 h wurde das Gewicht der Lungenstücke bestimmt, diese homogenisiert und in seriellen Verdünnungen auf BCYE-Agarplatten ausplattiert. Durch Auszählen der gewachsenen Kolonien wurde die jeweilige *cfu*/mL der einzelnen Stämme bestimmt (Abb. 5.32).

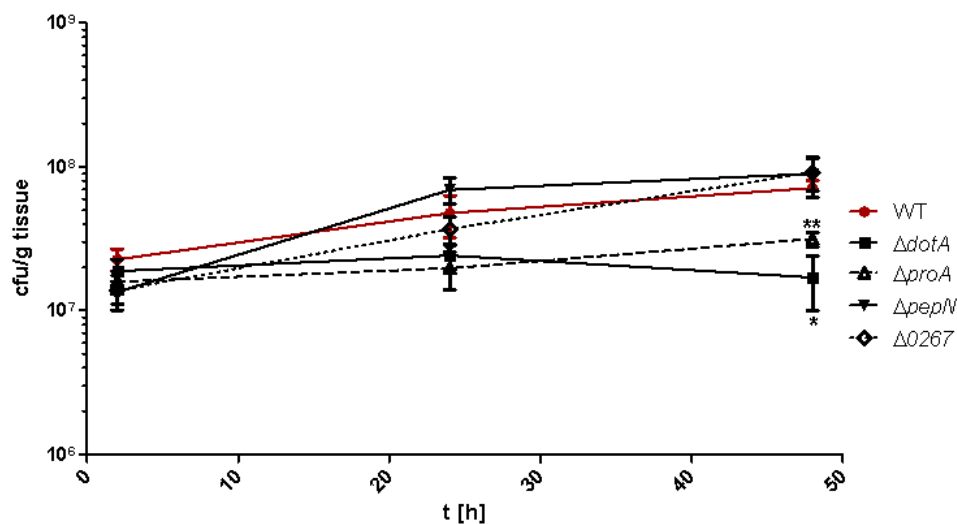


Abbildung 5.32: Replikation verschiedener *L. pneumophila* Corby Proteasemutanten in HLTEs. HLTEs wurden in kleine Stücke geschnitten und in Lungenmedium mit *L. pneumophila* Corby WT (Kreis, rot), *L. pneumophila* Corby $\Delta dotA$ (Viereck), *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ (Dreieck offen), *L. pneumophila* Corby Δlpc_0267 (Dreieck geschlossen) und *L. pneumophila* Corby $\Delta pepN$ (Raute) mit einer Zellzahl von 1×10^7 /mL infiziert. Nach 2 h, 24 h, 48 h und 72 h wurden die HLTEs gewogen, homogenisiert und durch Ausplattieren die jeweilige *cfu*/mL bestimmt. Die *proA*-defiziente Mutante zeigte dabei im Vergleich zum Wildtyp eine signifikant verringerte *cfu*/mL nach 48 h. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's *t*-Test ermittelt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$), \pm SEM: Standardfehler des Mittelwerts der Einzelwerte aus vier unabhängigen Experimenten.

Bei *L. pneumophila* Corby WT lag die *cfu*/mL nach 2 h bei durchschnittlich $2,3 \times 10^7$ und erhöhte sich nach 24 h auf $4,8 \times 10^7$. Dies entsprach einer Vermehrung um das 2-fache. Nach 48 h lag der *cfu*-Wert bei $7,1 \times 10^7$ /mL. Somit war dieser Wert 3-fach so hoch wie der 2 h-Wert. Die replikationsgeschwächte *dotA*-Deletionsmutante zeigte nach 2 h einen *cfu*-Wert von $1,9 \times 10^7$, welcher sich nach 24 h leicht auf

$2,4 \times 10^7$ cfu/mL steigerte. Jedoch sank der cfu-Wert nach 48 h auf $1,7 \times 10^7$ /mL und war somit signifikant um ein 4-faches reduziert im Vergleich zum Wildtyp. Bei der *proA*-defizienten Mutante war zu Beginn der Infektion (2 h) eine cfu/mL von $1,6 \times 10^7$ festzustellen. Nach 24 h erhöhte sich der cfu-Wert leicht auf $1,9 \times 10^7$ /mL und lag damit, im Vergleich zum Wildtyp, signifikant um ein 2,5-faches reduziert vor. In der späten Phase der Infektion, nach 48 h, konnte für *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ eine cfu/mL von durchschnittlich $3,2 \times 10^7$ bestimmt werden. Somit war dieser Wert um ein 2-faches signifikant geringer als der 48 h-Wert des Wildtyps. Die *lpc_0267*-defiziente Mutante wies nach 2 h einen cfu-Wert von $1,4 \times 10^7$ /mL auf, welcher sich nach 24 h auf durchschnittlich $3,7 \times 10^7$, bzw. nach 48 h auf $9,2 \times 10^7$ erhöhte. Ein signifikanter Unterschied zu *L. pneumophila* Corby WT war dabei nicht festzustellen. Bei der *pepN*-Deletionsmutante lag die cfu/mL nach 2 h bei durchschnittlich $1,3 \times 10^7$ und erhöhte sich nach 24 h auf $6,9 \times 10^7$. In der späten Phase der Infektion konnte ein cfu-Wert von $9,0 \times 10^7$ /mL ermittelt werden. Es lagen dabei keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp vor. Insgesamt konnte in diesem Versuch ein Einfluss von ProA auf die intrazelluläre Replikation in HLTEs nach 24 h und 48 h festgestellt werden.

5.4.8 ProA verursacht eine massive Gewebeschädigung während der HLTE-Infektion

Um die Rolle von ProA bei der Schädigung des Lungengewebes zu untersuchen, wurden HLTEs mit *L. pneumophila* Corby WT, *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$, 10 µg/mL nativem ProA und Lungenmedium über 2 h, 24 h und 48 h inkubiert. Die Versuche wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Torsten Goldmann am Forschungszentrum Borstel von Jana Tiefenau und Dr. Jens Jäger durchgeführt. Das Gewebe wurde anschließend mit der HOPE-Fixierungstechnik konserviert, dehydriert und für die histologische Untersuchung in Paraffin eingebettet. Für die mikroskopische Analyse wurden die Gewebeschnitte mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt. Die Bewertung der Gewebeschädigung (*Damage Score*) erfolgte nach den drei Kriterien Protein-Exudat, Ablösung des Epitheliums und Integrität der alveolaren Septen auf einer Skala von 0 (keine Schädigung) bis 3 (massive Schädigung). Die histologische Auswertung und Bestimmung des *Damage Scores* wurde von Dr. Sebastian Marwitz vom Forschungszentrum Borstel durchgeführt.

Nach 2 h konnte für keine der Bedingungen ein größerer Gewebeschaden festgestellt

5 Ergebnisse

werden. Die Mediumkontrolle zeigte nach 24 h geringe Epithelablösungen, kleinere Protein-Exudatansammlungen und eine leicht verschlechterte Alveolarintegrität (Abb. 5.33 A I-III).

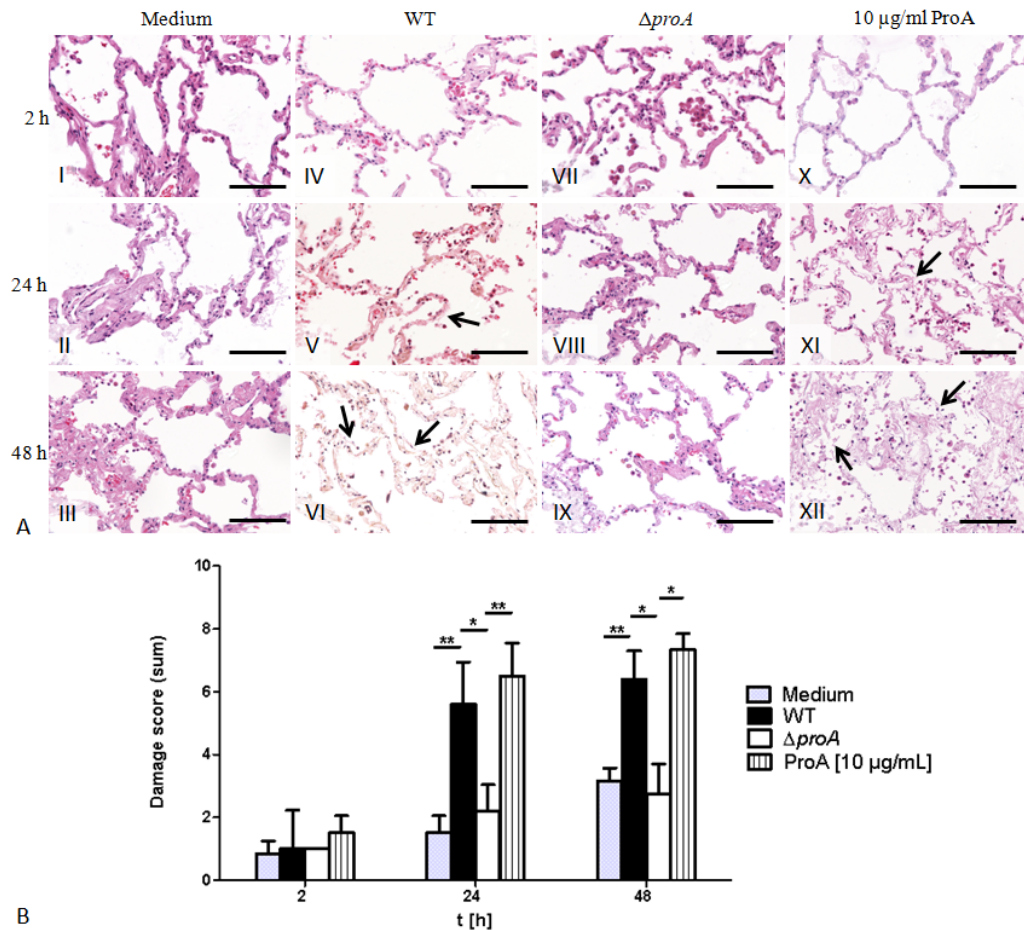


Abbildung 5.33: Gewebsschädigung in HLTEs durch Infektion mit *L. pneumophila* Corby. (A) Mikroskopische Untersuchung von HE-gefärbten HLTE-Schnitten nach Inkubation über 2 h, 24 h und 48 h mit *L. pneumophila* Corby WT, *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$, 10 $\mu\text{g/ml}$ ProA und Lungenmedium. Die Pfeile markieren Epithelablösungen. Maßstab: 50 μm . (B) Klassifizierung des Gewebeschadens der einzelnen Bedingungen (*Damage Score*) in den Kategorien Protein-Exudat, Epithelablösung und Integrität der Alveolarsepten. Die Bewertung erfolgte auf einer Skala von 0 (keine Schädigung) bis 3 (massive Schädigung). Dargestellt ist der Median aus sechs unabhängigen Experimenten. Die *proA*-Deletionsmutante verursachte einen deutlich geringeren Gewebeschaden als der Wildtyp. Die Inkubation der HLTEs mit ProA führte zu einer Schädigung ähnlich zu Wildtyp-infiziertem Lungengewebe. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests ermittelt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$), \pm SD.

Dies ergab, im Falle der Kontrolle, einen durchschnittlichen *Damage Score* von 1,5 (Abb. 5.33 B). Nach 48 h verschlechterte sich der Zustand des Gewebes auf einen *Damage Score* von 3,2. Besonders war hier die Integrität der alveolaren Septen betroffen.

Bei Infektion mit *L. pneumophila* Corby WT konnten im Gewebe besonders eine stark erhöhte Ansammlung von Protein-Exudaten beobachtet werden. Weiterhin war die alveolare Integrität deutlich schlechter, als bei der Mediumkontrolle und es konnten starke Ablösungen des Epithels detektiert werden (Abb. 5.33 A IV-VI). Entsprechend lag der *Damage Score* nach 24 h bei durchschnittlich 5,6 und erhöhte sich nach 48 h auf 6,4, wobei sich die Alveolarintegrität nochmals deutlich verschlechterte (Abb. 5.33 B). Bei der Infektion mit der *proA*-Deletionsmutante konnten nach 24 h nur eine leichte Verschlechterung der alveolaren Integrität, geringe Epithelablösungen und kleinere Exudatansammlungen beobachtet werden (Abb. 5.33 A VII-IX). Der Gewebeschaden war leicht erhöht im Vergleich zur Mediumkontrolle, jedoch signifikant geringer als bei Infektion mit dem Wildtyp. Insgesamt wurde der *Damage Score* hier auf 2,2 eingestuft und war somit 60,7 % niedriger als beim Wildtyp (Abb. 5.33 B). Nach 48 h erhöhte sich der *Damage Score* leicht auf 2,75. Damit blieb der Gewebeschaden sogar geringer als bei der Mediumkontrolle und im Vergleich zur Infektion mit dem Wildtyp um 57,0 % signifikant reduziert.

Weiterhin wurde das Lungengewebe mit nativem ProA inkubiert. Dabei konnten nach 24 h besonders eine stark verschlechterte Integrität der alveolaren Septen und vermehrte Epithelablösungen detektiert werden. Die Ansammlung von Protein-Exudaten war vergleichbar mit dem durch *L. pneumophila* Corby WT ausgelösten Schaden (Abb. 5.33 A X-XII). Der durch ProA ausgelöste Gewebeschaden wurde auf einen *Damage Score* von durchschnittlich 6,5 eingestuft und lag damit um 13,9 % höher als der Wildtyp (Abb. 5.33 B). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Im Vergleich zur Mediumkontrolle war der *Damage Score* jedoch um 76,9 % und zur Infektion mit *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ um 66,2 % signifikant erhöht. Nach 48 h wurde für die Inkubation mit nativem ProA ein *Damage Score* von durchschnittlich 7,3 festgestellt. Auch hier war wieder besonders die alveolare Integrität betroffen. Der Schaden war um 12,3 % höher als bei Infektion des Lungengewebes mit dem Wildtyp, jedoch konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Verglichen mit der Mediumkontrolle lag der durch ProA verursachte Gewebeschaden um 56,7 % und bei dem mit *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ infizierten Gewebe um 62,3 % signifikant erhöht vor. Zusammenfassend zeigte dieses Experiment, dass die Deletion des *proA*-Gens zu einer deutlichen Reduktion des durch *L. pneumophila* Corby verursachten Gewebeschadens führte und die Inkubation von HLTEs mit nativem ProA eine Schädigung vergleichbar mit der Wildtyp-Infektion herbeiführte.

5.5 Einfluss von ProA auf die Wirts-Immunantwort

In aktuellen Studien konnten für die alkalische Protease AprA und die Elastase LasB aus *P. aeruginosa* ein Einfluss auf die Flagellin-vermittelte Immunantwort bei Wirtszellinfektionen beobachtet werden. Beide Proteasen spalten extrazelluläres Flagellin und vermeiden dadurch die Detektion dessen durch den Rezeptor TLR5 und die damit verbundene Signalantwort (Bardoel et al., 2011, Casilag et al., 2015). Durch die Homologie der *Legionella*-Protease ProA zu LasB wurde für diese eine ähnliche Funktion vermutet. In den folgenden Unterkapiteln soll untersucht werden, ob die ProA Flagellin von *L. pneumophila* spalten kann und welche Auswirkungen dies möglicherweise auf die Immunantwort von Wirtszellen hat.

5.5.1 Isolierung von FlaA aus *L. pneumophila*

Für die Überprüfung, ob ProA *Legionella*-Flagellin (FlaA) spalten kann sowie die Durchführung weiterer Untersuchungen war es notwendig, reines FlaA zu gewinnen. Eine einfache Methode hierfür ist das Abscheren der Flagelle von den Bakterien selbst (Montie et al., 1982). Dafür wurden *L. pneumophila* Corby WT-Zellen nach Inkubation für 5 d bei 30 °C von BCYE-Agarplatten gespült und für 3 min homogenisiert. Zu Kontrollzwecken wurden weiterhin *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ und *L. pneumophila* Corby $\Delta flaA$ für die Isolierung verwendet. Nach dem Entfernen der Zellen durch Zentrifugation wurden die Flagellen im Überstand mittels Ultrazentrifugation gewonnen. Die Überstände sowie die erhaltenen Proteinpellets nach der Ultrazentrifugation wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. Dafür wurden jeweils 20 µg Protein auf das SDS-Gel aufgetragen (Abb. 5.34).

Auf dem Coomassie Silver-Blue-gefärbten SDS-Gel konnten nur im Pellet deutliche Proteinbanden beobachtet werden. Der Überstand wies dagegen nur sehr schwache und diffuse Proteinbanden auf. Eine deutliche Bande auf der für FlaA erwarteten Höhe zwischen der 40 kDa- und der 55 kDa-Markerbande waren nur im Falle des Wildtyps und der *proA*-defizienten Mutante zu sehen (Abb. 5.34 A). Eine Überprüfung mittels Western Blot und spezifischem anti-FlaA-Antikörper zeigte, dass es sich um das 47 kDa große FlaA-Protein handelte (Abb. 5.34 B). Sowohl im SDS-Gel als auch im Western-Blot fehlte diese Bande in den Pelletproben der *flaA*-negativen Mutante. Die Isolation von nativem FlaA aus *L. pneumophila* Corby war somit erfolgreich.

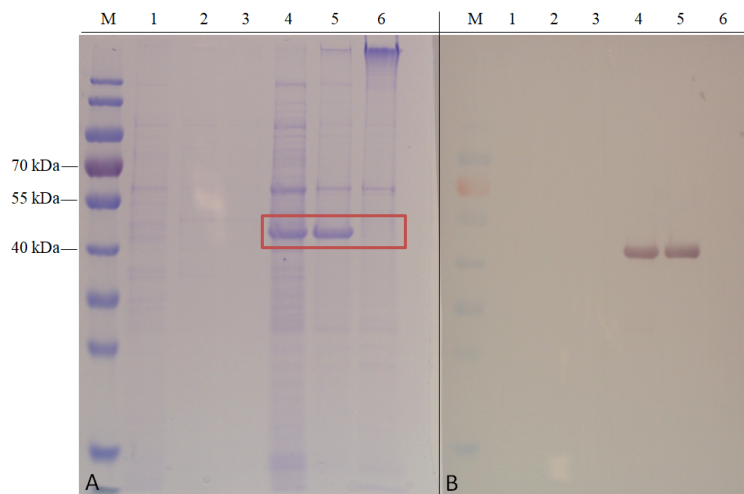


Abbildung 5.34: Isolierung von FlaA aus *L. pneumophila* Corby. Kulturen von *L. pneumophila* Corby WT, *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ und *L. pneumophila* Corby $\Delta flaA$ wurden nach 5 d bei 30 °C von BCYE-Agarplatten gespült und homogenisiert. Nach Entfernen der Bakterienzellen durch Zentrifugation wurde die Flagellin-haltige Fraktion mittels Ultrazentrifugation (UZ) isoliert. Von jeder Fraktion wurden jeweils 20 µg Protein für die SDS-PAGE verwendet. Die Proteine auf dem SDS-Gel wurden mit Coomassie Silver-Blue gefärbt (A). Der Nachweis von FlaA erfolgte mit einem spezifischen anti-FlaA Antikörper und alkalischer Phosphatase-Reaktion im Western Blot (B). (1) Überstand nach UZ von *L. pneumophila* Corby WT, (2) Überstand *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$, (3) Überstand von *L. pneumophila* Corby $\Delta flaA$, (4) Pellet *L. pneumophila* Corby WT, (5) Pellet *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$, (6) Pellet *L. pneumophila* Corby $\Delta flaA$. Als Marker (M) wurde PageRuler™ Prestained Protein Ladder von ThermoScientific verwendet. FlaA konnte erfolgreich aus *L. pneumophila* Corby WT und *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ isoliert werden.

5.5.2 ProA degradiert monomeres Flagellin

Um zu überprüfen, ob ProA das Flagellin von *L. pneumophila* Corby degradieren kann, wurde zunächst monomeres FlaA aus isolierten Flagellen (siehe Kapitel 5.5.1) durch Inkubation für 20 min bei 70 °C generiert. Für den Degradationsversuch wurden jeweils 1 µg/mL polymeres, bzw. monomeres Flagellin mit 0 µg/mL, 0,01 µg/mL, 0,03 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,3 µg/mL, 1 µg/mL und 3 µg/mL nativem ProA versetzt. Anschließend wurden die Ansätze für 1 h bei 37 °C inkubiert. Als Vorbereitung für die Analyse mittels SDS-PAGE und Western Blot wurden die Proben direkt mit 4 x SDS-Ladepuffer versetzt und nach Erhitzen für 5 min bei 95 °C auf SDS-Gele aufgetragen. Die SDS-Gele wurden aufgrund der höheren Sensitivität mit Silberfärbung gefärbt. Der Nachweis von FlaA im Western Blot erfolgte mittels spezifischem anti-FlaA Antikörper und alkalischer Phosphatase-Reaktion (Abb. 5.35).

Bei Inkubation mit polymerem Flagellin konnten bei allen eingesetzten Konzentrationen von ProA ähnliche Bandenmuster auf dem Silber-gefärbten SDS-Gel beobachtet

5 Ergebnisse

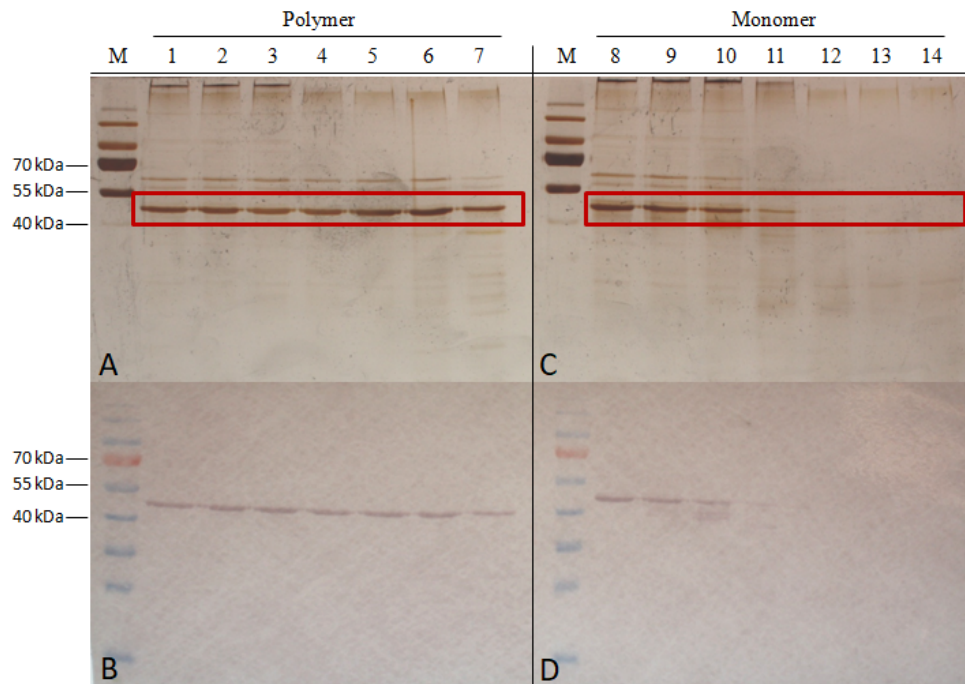


Abbildung 5.35: Degradation von Flagellin durch ProA. Es wurden je 1 $\mu\text{g/mL}$ polymeres (1-7), bzw. monomeres (8-14) Flagellin mit 0 $\mu\text{g/mL}$ (1, 8), 0,01 $\mu\text{g/mL}$ (2, 9), 0,03 $\mu\text{g/mL}$ (3, 10), 0,1 $\mu\text{g/mL}$ (4, 11), 0,3 $\mu\text{g/mL}$ (5, 12), 1 $\mu\text{g/mL}$ (6, 13) und 3 $\mu\text{g/mL}$ (7, 14) gereinigtem ProA für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Die SDS-Gele (oben) wurden mit Silberfärbung behandelt. Der spezifische Nachweis von FlaA erfolgte mit einem anti-FlaA Antikörper und alkalischer Phosphatase-Reaktion. Als Marker (M) wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder von ThermoScientific verwendet. Die Inkubation mit 0,3 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$ und 3 $\mu\text{g/mL}$ ProA führte zur vollständigen Degradation von monomerem FlaA. Polymeres Flagellin konnte durch ProA nicht gespalten werden.

werden (Abb. 5.35 A). Dominant war dabei eine Proteinbande zwischen der 40 kDa- und der 55 kDa-Markerbande. Mittels Western Blot konnte diese Bande als FlaA identifiziert werden (Abb. 5.35 B). Die FlaA-Bande zeigte bei allen eingesetzten ProA-Konzentrationen eine ähnliche Intensität. Auch bei Inkubation mit monomerem Flagellin konnten bei Inkubation mit 0 $\mu\text{g/mL}$, 0,01 $\mu\text{g/mL}$ und 0,03 $\mu\text{g/mL}$ ProA ähnliche Bandenmuster beobachtet werden. Auf dem mit Silberfärbung behandelten SDS-Gel zeigte sich jeweils eine dominante Bande bei 47 kDa, die mittels Western Blot als FlaA identifiziert werden konnte (Abb. 5.35 C-D). Bei einer ProA-Konzentration von 0,03 $\mu\text{g/mL}$ waren auf dem Blot jedoch zusätzlich weitere Banden unterhalb der FlaA-Bande zu erkennen. Nach Inkubation mit einer ProA-Konzentration von 0,1 $\mu\text{g/mL}$ war die FlaA-Bande sowohl auf dem SDS-Gel als auch auf dem Western Blot nur noch sehr schwach zu erkennen. Ab einer eingesetzten ProA-Konzentration von 0,3 $\mu\text{g/mL}$

konnte FlaA weder auf dem Silber-gefärbten SDS-Gel noch durch Detektion mit einem spezifischen anti-FlaA Antikörper nachgewiesen werden. Mit Hilfe dieses Versuches konnte gezeigt werden, dass ProA monomeres, jedoch nicht polymeres Flagellin hydrolisieren kann.

5.5.3 ProA verhindert die TLR5-Aktivierung durch FlaA

Bakterielles Flagellin ist ein potenter Auslöser proinflammatorischer Antworten und wird extrazellulär durch den Rezeptor TLR5 detektiert (Gewirtz et al., 2001, Cobb et al., 2004). Um zu klären, ob die Degradation von monomerem FlaA durch ProA die natürliche Immunantwort von Säugetierzellen beeinflusst, wurde die hTLR5-exprimierende Zelllinie HEK-Blue™ von InvivoGen verwendet. Dabei kann eine Aktivierung von TLR5 durch die Aktivität der *secreted embryonic alkaline phosphatase* (SEAP) bei OD₆₂₀ detektiert werden. Die Zellen wurden für 16 h bei 37 °C und 5 % CO₂ mit unterschiedlichen Konzentration an nativem FlaA und/oder ProA inkubiert. Als Positivkontrolle wurden immer 100 ng/mL FliC von *P. aeruginosa* sowie 1 x PBS als Negativkontrolle mitgeführt (Abb. 5.36).

Bei Inkubation von HEK-Blue™-Zellen mit 0,05 ng/mL, 0,1 ng/mL und 0,5 ng/mL FlaA mit 1 x PBS konnte jeweils eine ähnliche OD₆₂₀ von 0,34-0,39 detektiert werden. Bei Inkubation mit 0 ng/mL FlaA (Daten nicht gezeigt) konnte eine OD₆₂₀ von 0,35 ermittelt werden. Somit fand bei niedrigen FlaA-Konzentrationen noch keine hTLR5-Aktivierung statt. Bei Erhöhung der FlaA-Konzentration auf 1 ng/mL lag die OD₆₂₀ bei durchschnittlich 0,46. Demnach wurde für den Nachweis der hTLR5-Aktivierung durch FlaA mindestens diese Proteinkonzentration benötigt.

Die OD₆₂₀ erhöhte sich bei Einsatz von 5 ng/mL FlaA leicht auf 0,48 und bei 10 ng/mL auf 0,63. Ein deutlicher Anstieg der hTL5-Aktivierung konnte bei Inkubation der HEK-Blue™-Zellen mit 50 ng/mL Flagellin verzeichnet werden, wobei die OD₆₂₀ bei 1,6 lag. Die höchste hier verwendete FlaA-Konzentration betrug 100 ng/mL und ergab eine durchschnittliche OD₆₂₀ von 1,8. Mit steigender Konzentration von eingesetztem FlaA konnte somit eine parallel zunehmende hTLR5-Aktivierung verzeichnet werden. Bei zeitgleicher Inkubation von ansteigenden FlaA-Konzentrationen mit 1 µg/mL ProA konnte dagegen keine Erhöhung der OD₆₂₀ und somit keine hTLR5-Aktivierung beobachtet werden. Die gemessenen OD₆₂₀-Werte lagen zwischen 0,33 und 0,36. Es gab somit keine Differenz zur Negativkontrolle (Abb. 5.36 A).

Des Weiteren wurden verschiedene Konzentrationen von ProA zusammen mit 1 x PBS

5 Ergebnisse

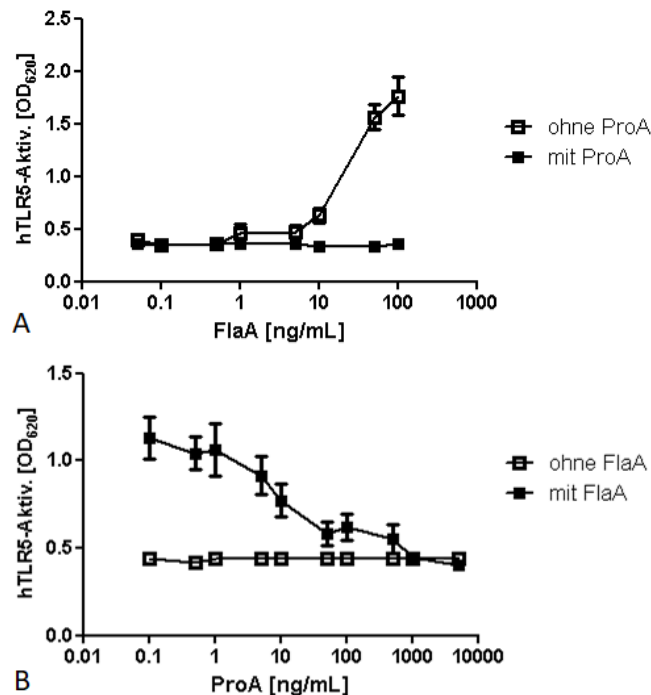


Abbildung 5.36: hTLR5-Aktivierung in HEK-Blue™-Zellen bei Inkubation mit FlaA und ProA. HEK-Blue™-Zellen wurden mit verschiedenen FlaA- und ProA-Konzentrationen inkubiert. Die hTLR5-Aktivierung wurde durch Aktivierung von SEAP bei OD₆₂₀ detektiert. (A) Inkubation von 0,05 ng/mL, 0,1 ng/mL, 0,5 ng/mL, 1 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 50 ng/mL und 100 ng/mL FlaA mit PBS (Quadrat weiß) oder 1 µg/mL ProA (Quadrat schwarz). (B) Inkubation von 0,1 ng/mL, 0,5 ng/mL, 1 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL, 500 ng/mL, 1.000 ng/mL und 5.000 ng/mL ProA mit PBS (Quadrat Weiß) oder 30 ng/mL FlaA (Quadrat schwarz). ProA verhindert die hTLR5-Aktivierung in HEK-Blue™-Zellen. ± SEM.

oder 30 ng/mL FlaA mit den HEK-Blue™-Zellen getestet. Bei Inkubation von ProA mit 1 x PBS lagen die gemessenen OD₆₂₀-Werte für alle eingesetzten Proteinkonzentrationen bei 0,41 bis 0,44. Die OD₆₂₀ für die Negativkontrolle (1 x PBS, Daten nicht gezeigt) betrug 0,44. Demnach konnte für ProA allein keine hTLR5-Aktivierung nachgewiesen werden. Unter Zugabe von FlaA wurde bei einer ProA-Konzentration von 0,1 ng/mL eine OD₆₂₀ von 1,13 detektiert. Diese sank durch Erhöhung der Protease-Konzentration stetig und erreichte bei der höchsten verwendeten ProA-Konzentration von 5.000 ng/mL eine OD₆₂₀ von 0,40. Dieser Wert war vergleichbar mit dem der Negativkontrolle. Somit konnte bei Inkubation der HEK-Blue™-Zellen mit 5.000 ng/mL ProA keine hTLR5-Aktivierung in Gegenwart von 30 ng/mL FlaA mehr gemessen werden (Abb. 5.36 B). Insgesamt zeigten die Ergebnisse, dass ProA durch Degradation von FlaA in der Lage ist, die hTLR5-Aktivierung zu unterdrücken.

5.5.4 Die *proA*-Deletionsmutante induziert eine erhöhte Aktivierung von TLR5

Um zu überprüfen, wie die Aktivierung von TLR5 unter Verwendung von Bakterienzellen beeinflusst wird, wurde die hTLR5-exprimierende Zelllinie HEK-Blue™ mit 10^7 cfu/mL *L. pneumophila* Corby WT, *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ und *L. pneumophila* Corby $\Delta flaA$ inkubiert. Für die Komplementation der fehlenden Proteinfunktion wurden die *proA*-Deletionsmutante zusätzlich mit 1 μ g/mL ProA und die *flaA*-defiziente Mutante mit 30 ng/mL FlaA inkubiert. Als Kontrollen wurden die HEK-Blue™-Zellen mit 1 x PBS, 1 μ g/mL ProA oder 100 ng/mL FlaA behandelt (Abb. 5.37).

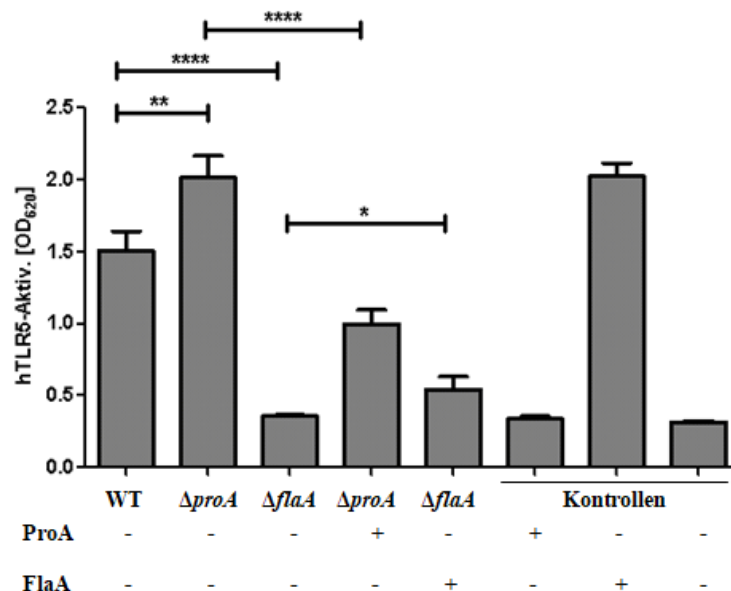


Abbildung 5.37: Aktivierung von hTLR5 in HEK-Blue™-Zellen bei Inkubation mit *L. pneumophila* Corby. Die hTLR5-Aktivierung wurde durch Aktivierung von SEAP bei OD₆₂₀ detektiert. (A) Stimulation der HEK-Blue™-Zellen mit *L. pneumophila* Corby WT, *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ und *L. pneumophila* Corby $\Delta flaA$. Die Proteinfunktionen wurden mit 1 μ g/mL ProA oder 30 ng/mL FlaA komplementiert. Als Kontrollen dienten 1 μ g/mL ProA, 100 ng/mL FlaA und 1 x PBS. Die *proA*-Deletionsmutante zeigte eine signifikant erhöhte hTLR5-Aktivierung. Der Effekt ließ sich durch Zugabe von ProA komplementieren. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus fünf unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's *t*-Test ermittelt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,0001$), \pm SEM.

Bei Inkubation der HEK-Blue™-Zellen mit dem Wildtyp ließ sich eine durchschnittliche OD₆₂₀ von 1,51 bestimmen. Die OD₆₂₀ der Negativkontrolle mit 1 x PBS lag bei 0,31. Somit konnte eine hTLR5-Aktivierung durch den Wildtyp festgestellt werden.

5 Ergebnisse

Bei Stimulation der HEK-Blue™-Zellen mit der *proA*-Deletionsmutante wurde eine durchschnittliche OD₆₂₀ von 2,02 gemessen. Der Wert entsprach damit dem 1,3-fachen der gemessenen OD₆₂₀ bei Inkubation mit dem Wildtyp und war signifikant erhöht. Bei gleichzeitiger Zugabe von 1 µg/mL gereinigtem ProA zu der *proA*-negativen Mutante reduzierte sich die gemessene OD₆₂₀ um die Hälfte auf 1,0. Bei Stimulation der HEK-Blue™-Zellen mit *L. pneumophila* Corby Δ *flaA* wurde eine OD₆₂₀ von 0,36 ermittelt. Dieser Wert war vergleichbar mit der Negativkontrolle. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass durch die *flaA*-Deletionsmutante keine hTLR5-Aktivierung ausgelöst wurde. Bei gleichzeitiger Zugabe von 30 ng/mL FlaA zu der *flaA*-negativen Mutante erhöhte sich die OD₆₂₀ 1,5-fach auf durchschnittlich 0,54. Eine hTLR5-Aktivierung war somit wieder detektierbar. Bei Inkubation der HEK-Blue™-Zellen mit 100 ng/mL FlaA (Positivkontrolle) wurde eine OD₆₂₀ von 2,02 sowie bei Stimulation mit 1 µg/mL ProA eine OD₆₂₀ von 0,33 gemessen. Die Ergebnisse dieses Versuches zeigten, dass die *proA*-Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte TLR5-Aktivierung induziert. Durch Zugabe von nativem ProA konnte die Aktivierung reduziert werden. Um die Komplementation mit gereinigtem Protein genauer zu quantifizieren, wurden HEK-Blue™-Zellen mit *L. pneumophila* Corby Δ *flaA*, bzw. *L. pneumophila* Corby Δ *proA* und 0,05 ng/mL, 0,1 ng/mL, 0,5 ng/mL, 1 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 50 ng/mL und 100 ng/mL FlaA, bzw. 0,1 ng/mL, 0,5 ng/mL, 1 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL, 500 ng/mL, 1.000 ng/mL und 5.000 ng/mL ProA inkubiert (Abb. 5.38).

Bei Inkubation der HEK-Blue™-Zellen mit *L. pneumophila* Corby Δ *flaA* wurde eine OD₆₂₀ von 0,31 detektiert. Die Negativkontrolle (1 x PBS) lag bei OD₆₂₀ 0,29. Nach Zugabe von 0,05 ng/mL und 0,1 ng/mL FlaA konnte keine Erhöhung der OD₆₂₀ detektiert werden. Bei Komplementation mit 0,5 ng/mL FlaA erhöhte sich die OD₆₂₀ leicht auf 0,37 und steigerte sich mit 1 ng/mL Flagellin weiter auf OD₆₂₀ 0,41. Die Inkubation der *flaA*-Deletionsmutante mit 5 ng/mL FlaA ergab eine OD₆₂₀ von 0,6. Diese erhöhte sich bei 10 ng/mL FlaA auf OD₆₂₀ 0,79, bei 50 ng/mL FlaA auf OD₆₂₀ 1,43 und bei 100 ng/mL FlaA auf OD₆₂₀ 1,94. Je höher also die zugebene Konzentration an nativem Flagellin war, desto stärker fiel auch die hTLR5-Aktivierung aus. Durch Komplementation mit FlaA konnte die hTLR5-Aktivierung der *flaA*-Deletionsmutante somit erhöht werden (Abb. 5.38 A). Bei Stimulation der HEK-Blue™-Zellen mit *L. pneumophila* Corby Δ *proA* lag die gemessene OD₆₂₀ bei 2,07. Nach Zugabe von 0,1-10 ng/mL ProA konnte keine signifikante Reduktion der hTLR5-Aktivierung detektiert werden.

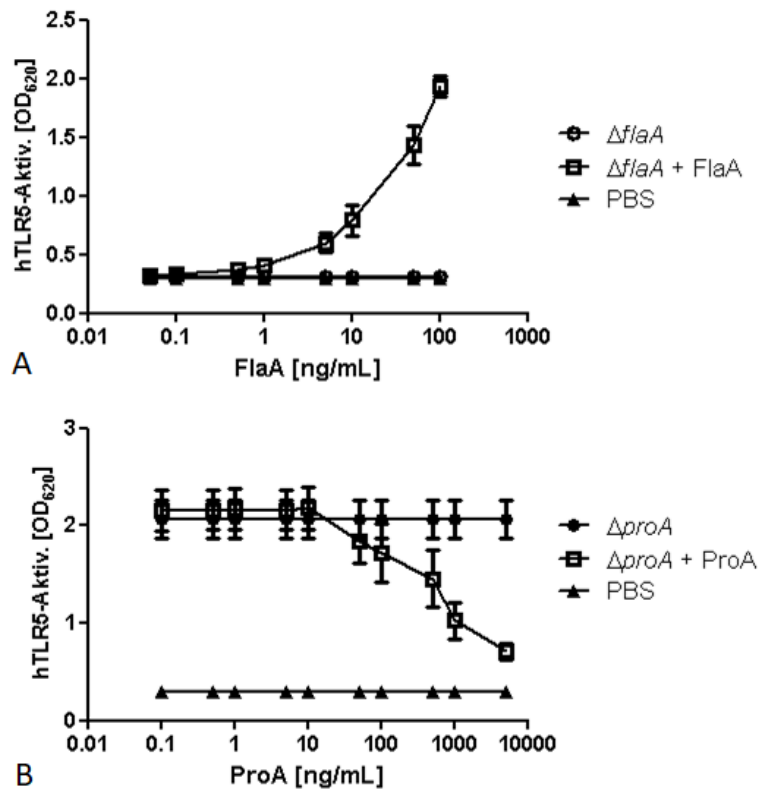


Abbildung 5.38: Konzentrationsabhängige hTLR5-Aktivierung in HEK-Blue™-Zellen bei Inkubation mit *L. pneumophila* Corby. Die hTLR5-Aktivierung wurde durch Aktivierung von SEAP bei OD₆₂₀ detektiert. (A) Inkubation von *L. pneumophila* Corby $\Delta flaA$ (Kreis) mit 0,05 ng/mL, 0,1 ng/mL, 0,5 ng/mL, 1 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 50 ng/mL und 100 ng/mL FlaA (Quadrat). Als Kontrolle diente 1 x PBS (Dreieck). Die Zugabe von FlaA führte zu einer Erhöhung der hTLR5-Aktivierung von *L. pneumophila* Corby $\Delta flaA$. \pm SEM. (B) Inkubation von *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ (Kreis) mit 0,1 ng/mL, 0,5 ng/mL, 1 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL, 500 ng/mL, 1.000 ng/mL und 5.000 ng/mL ProA (Quadrat). Als Kontrolle diente 1 x PBS (Dreieck). Durch Zugabe von ProA wurde die hTLR5-Aktivierung der *proA*-Deletionsmutante reduziert. \pm SEM

Erst bei Komplementation mit 50 ng/mL ProA verringerte sich die OD₆₂₀ auf 1,84. Nach Zugabe von 100 ng/mL Protease reduzierte sich die OD₆₂₀ weiter auf 1,72. Mit 500 ng/mL ProA lag die OD₆₂₀ bei durchschnittlich 1,46, mit 1.000 ng/mL ProA bei 1,03 und mit 5.000 ng/mL ProA bei 0,71. Durch Zugabe von ProA konnte die hTLR5-Aktivierung durch *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ somit um ein 3-faches reduziert werden (Abb. 5.38 B).

5.5.5 ProA reduziert die Aktivierung von TLR5 während der HLTE-Infektion

Um zu überprüfen, ob die Degradation von FlaA durch ProA die TLR5-Aktivität beeinflusst, wurden HLTEs in kleine Stücke geschnitten und mit *L. pneumophila* Corby WT, *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ und *L. pneumophila* Corby $\Delta flaA$ infiziert. Für die Komplementation der fehlenden Proteinfunktionen wurden die *proA*-Deletionsmutante zusätzlich mit 1 $\mu\text{g/mL}$ ProA und die *flaA*-defiziente Mutante mit 100 ng/mL FlaA inkubiert. Als Negativkontrolle wurde in Lungenmedium inkubiertes Gewebe verwendet. Nach 2 h wurden die Kulturüberstände entnommen und zusammen mit der hTLR5-exprimierenden Zelllinie HEK-Blue™ inkubiert. Die Aktivierung von hTLR5 wurde durch Messung der OD₆₂₀ bestimmt.

Die gemessene OD₆₂₀ wurde dabei pro g Gewebe berechnet und lag bei den mit dem Wildtyp infizierten HLTEs durchschnittlich bei 16,02. Bei der Negativkontrolle konnte eine OD₆₂₀ von 4,0/g Gewebe detektiert werden. Somit zeigte der Kulturüberstand bei Inkubation der HLTEs mit *L. pneumophila* Corby WT eine deutlich erhöhte hTLR5-Aktivierung der HEK-Blue™-Zellen. Für den Kulturüberstand der *proA*-Deletionsmutante wurde eine OD₆₂₀ von durchschnittlich 24,84/g Gewebe bestimmt. Dieser Wert war im Vergleich zum Wildtyp-Überstand auf ein 1,6-faches erhöht. Demnach führte die Infektion des Lungengewebes mit *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ zu einer signifikant erhöhten hTLR5-Aktivierung im Vergleich zum Wildtyp. Bei Komplementation der Abwesenheit von ProA in der *proA*-negativen Mutante mit 1 $\mu\text{g/mL}$ gereinigtem ProA wurde eine durchschnittliche OD₆₂₀ von 10,18/g Gewebe detektiert. Somit sank die hTLR5-Aktivierung nach Zugabe der Protease auf ein 2,4-faches. Die gemessene OD₆₂₀/g Gewebe des Kulturüberstandes der *flaA*-negativen Mutante lag durchschnittlich bei 3,58 und war vergleichbar mit der Negativkontrolle. Nach Zugabe von 100 ng/mL FlaA erhöhte sich die OD₆₂₀ auf ein 2,5-faches auf 8,95/g Gewebe. Die hTLR5-Aktivierung konnte somit wiederhergestellt werden (Abb. 5.39). Die Ergebnisse dieses Versuches zeigten, dass *L. pneumophila* die Flagellin-abhängige TLR5-Aktivierung bei HLTE-Infektionen auslösen kann und ProA eine wichtige Rolle bei der Verhinderung der Immundetektion spielt.

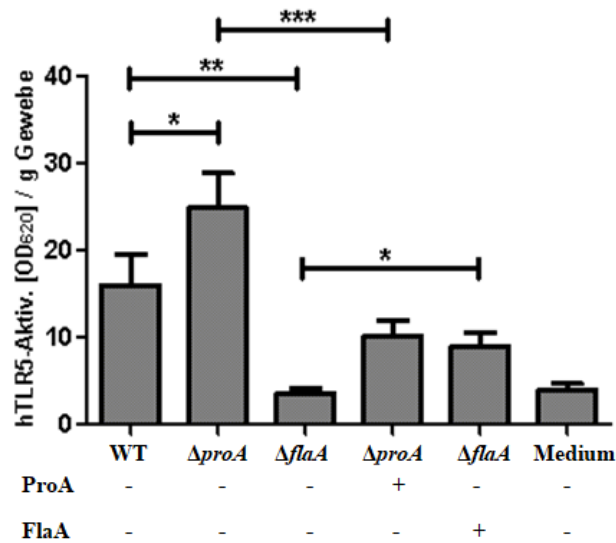


Abbildung 5.39: hTLR5-Aktivierung in HEK-Blue™-Zellen durch HLTE-Überstände. HLTEs wurden mit *L. pneumophila* Corby WT, *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ und *L. pneumophila* Corby $\Delta flaA$ infiziert. Für die Komplementation der fehlenden Proteinfunktionen wurden die *proA*-defiziente Mutante zusätzlich mit 1 μ g/mL ProA und die *flaA*-defiziente Mutante mit 100 ng/mL FlaA inkubiert. Als Negativkontrolle diente Gewebe in Lungenmedium. Nach 2 h wurden die Kulturüberstände entnommen und für 16 h mit HEK-Blue™-Zellen inkubiert. Die hTLR5-Aktivierung wurde durch Messung der SEAP-Aktivität bei OD₆₂₀ bestimmt. Bei Infektion mit der *proA*-Deletionsmutante konnte eine signifikant erhöhte hTLR5-Aktivierung detektiert werden. Durch Zugabe von gereinigtem ProA ließ sich diese wieder reduzieren. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus sechs unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's *t*-Test ermittelt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$), \pm SEM.

5.5.6 ProA verhindert die CXCL8-Produktion in HLTEs

Es konnte bisher gezeigt werden, dass ProA durch Spaltung von Flagellin die Aktivierung von humanem TLR5 auch in HLTEs verhindern kann. Die Aktivierung von TLR5 führt zur Ausschüttung des proinflammatorischen Chemokins IL-8, welches in humanen Zellen von dem *CXCL8*-Gen codiert wird. Um zu überprüfen, wie sich der Einfluss von ProA auf die CXCL8-Produktion im Lungengewebe auswirkt, wurden die Kulturüberstände von mit *L. pneumophila* Corby WT, *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ und *L. pneumophila* Corby $\Delta flaA$ infizierten HLTEs (siehe Kapitel 5.5.5) mittels ELISA vermessen. Die Bestimmung der CXCL8-Konzentration der Proben erfolgte anhand einer Eichgeraden und wurde pro g Gewebe berechnet. Da dieser Versuch stark vom Zustand des Lungengewebes abhing, konnten für die Auswertungen nur Ergebnisse von zwei Donoren herangezogen werden (Abb. 5.40). Eine statistische Auswertung konnte aufgrund der geringen Anzahl an Werten nicht durchgeführt werden.

5 Ergebnisse

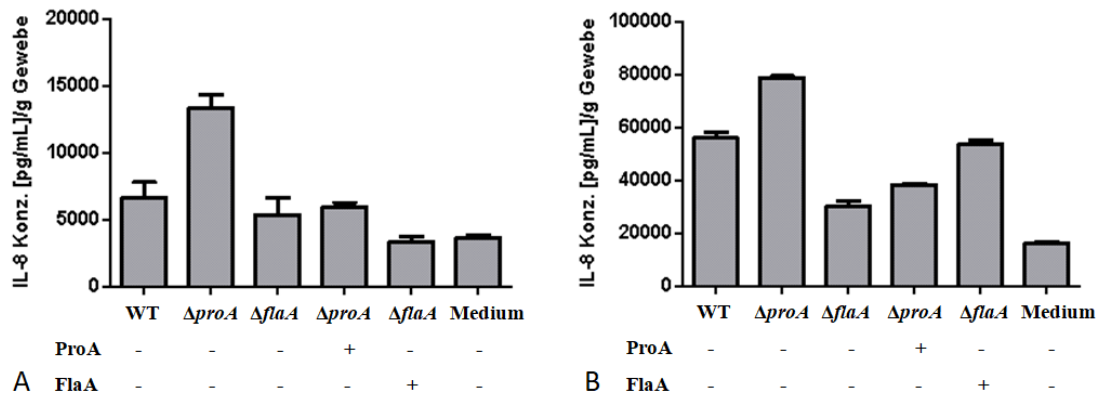


Abbildung 5.40: Bestimmung der CXCL8-Konzentration in *L. pneumophila*-infizierten HLTE-Überständen. HLTEs wurde mit *L. pneumophila* Corby WT, *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ und *L. pneumophila* Corby $\Delta flaA$ infiziert. Für die Komplementation der fehlenden Proteinfunktion wurde die *proA*-defiziente Mutante zusätzlich mit 1 μ g/mL ProA und die *flaA*-defiziente Mutante mit 100 ng/mL FlaA inkubiert. Als Negativkontrolle diente in Lungenmedium kultiviertes Gewebe. Nach 2 h wurden die Kulturüberstände entnommen und die CXCL8-Konzentration mittels ELISA-Kit "DuoSet®" (R & D Systems) bestimmt. Diese wurde anhand einer Eichgeraden und pro g Gewebe berechnet. Die Graphen (A) und (B) stellen jeweils die Ergebnisse von einem Donor dar. Die *proA*-defiziente Mutante zeigte tendenziell eine höhere CXCL8-Produktion, die durch Zugabe von gereinigtem ProA wieder reduziert werden konnte. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler von in Duplikaten durchgeführten Messungen. \pm SEM.

Bei den Kulturüberständen von mit dem Wildtyp infizierten HLTEs des ersten Donors konnte eine durchschnittliche Konzentration an CXCL8 von 6.497,90 pg/mL pro g Gewebe gemessen werden. Diese war im Vergleich zur Kontrolle (uninfiziertes Gewebe), die eine CXCL8-Konzentration von 3.620,58 pg/mL pro g Gewebe aufwies, auf das 1,8-fache erhöht. Bei Infektion mit *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ wurde eine durchschnittliche CXCL8-Konzentration von 13.236,63 pg/mL pro g Gewebe detektiert. Diese lag somit um ein 2-faches höher als bei Infektion mit dem Wildtyp. Durch zusätzliche Inkubation mit 1 μ g/mL gereinigtem ProA ließ sich die Chemokin-Konzentration um ein 2,3-faches auf 5.870,75 pg/mL pro g Gewebe reduzieren. Infektion der HLTEs mit *L. pneumophila* Corby $\Delta flaA$ führte zur Produktion von durchschnittlich 5.229,69 pg/mL CXCL8 pro g Gewebe. Der Wert war somit im Vergleich zur Kontrolle um ein 1,4-faches erhöht, jedoch auch 1,2-fach niedriger als bei Infektion mit dem Wildtyp. Die zusätzliche Infektion mit 100 ng/mL gereinigtem FlaA führte jedoch in diesem Experiment zu einer Reduktion der CXCL8-Konzentration auf 3.273,34 pg/mL pro g Gewebe. Der Wert lag dabei sogar niedriger als bei der uninfizierten Kontrolle (Abb. 5.40 A).

Beim zweiten Donor lagen die gemessenen CXCL8-Konzentrationen insgesamt deutlich höher als beim ersten Donor, was verdeutlicht, dass die Eigenschaften des explantierten Lungengewebes der verschiedenen Spender oft unterschiedlich sind. Jedoch waren die Verhältnisse der gemessenen CXCL8-Konzentrationen der verschiedenen Ansätze sehr ähnlich. Bei Infektion mit *L. pneumophila* Corby WT wurde eine durchschnittliche CXCL8-Konzentration von 55.871,96 pg/mL pro g Gewebe detektiert. Diese war im Vergleich zur uninfizierten Kontrolle 3,5-fach erhöht, bei der eine CXCL8-Konzentration von 16.051,03 pg/mL pro g Gewebe gemessen wurde. Bei Infektion mit *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ konnte eine mittlere CXCL8-Konzentration von 78.777,83 pg/mL pro g Gewebe bestimmt werden. Diese war im Vergleich zum Wildtyp auf ein 1,4-faches erhöht. Bei Komplementation der ProA-Funktion mit gereinigtem ProA wurde eine Reduktion der Chemokin-Konzentration auf ein 2,1-faches auf durchschnittlich 38.414,56 pg/mL pro g Gewebe gemessen. Bei den Kulturüberständen von *L. pneumophila* Corby $\Delta flaA$ -infizierten HLTEs wurde eine CXCL8-Konzentration von 29.978,76 pg/mL pro g Gewebe bestimmt. Diese lag somit um ein 1,9-faches höher als bei der Kontrolle, jedoch auch um den gleichen Faktor niedriger als nach Infektion mit *L. pneumophila* Corby WT. Bei zusätzlicher Inkubation mit 100 ng/mL gereinigtem FlaA konnte eine deutlich höhere Chemokin-Konzentration im Kulturüberstand detektiert werden. Diese lag bei durchschnittlich 53.717,18 pg/mL pro g Gewebe und somit vergleichbar mit der gemessenen Konzentration nach Infektion der HLTEs mit dem Wildtyp. Im Vergleich zum ersten Donor konnte hier eine deutlich erhöhte CXCL8-Konzentration bei Komplementation der FlaA-Funktion durch gereinigtes Flagellin gemessen werden (Abb. 5.40 B). Insgesamt zeigten diese Versuche, dass ProA in der Lage ist, die CXCL8-Produktion in infizierten HLTEs zu reduzieren.

6 Diskussion

Bakterielle Proteasen hydrolysieren Peptidbindungen und können somit Proteine und Peptide degradieren. Infolgedessen spielen sie in Prokaryoten eine wichtige physiologische Rolle und beeinflussen ein breites Spektrum an biologischen Prozessen (Hoge et al., 2010). Für *L. pneumophila* sind Proteasen unter anderem deshalb essentiell, weil sie vor allem Aminosäuren als primäre Energiequelle nutzen (Pine et al., 1984, Eylert et al., 2010). Als bisher am besten charakterisierte Protease von *L. pneumophila* gilt ProA. Doch obwohl ProA zu einer der ersten in *L. pneumophila* untersuchten Faktoren gehört, sind viele Funktionen der Protease bis heute nicht eindeutig geklärt. ProA ist das meist sezernierte Protein von *L. pneumophila* und eine Assoziation mit der Virulenz des Lungenpathogens wurde bereits in früheren Ansätzen vermutet (z.B. (Conlan et al., 1986, Moffat et al., 1994b, Edelstein et al., 1999)). Für ein tieferes Verständnis der Pathogenitätsmechanismen von *L. pneumophila* ist die eindeutige Aufklärung der Funktionen dieser sezernierten Protease somit von großer Wichtigkeit. In dieser Arbeit wurden daher Ansätze in Vorbereitung auf die Strukturaufklärung von ProA durchgeführt und eine Deletionsmutante erstellt. Weiterhin wurde der Einfluss dieser Zink-Metalloprotease auf das Sekretom von *L. pneumophila*, die *Sliding Motility* sowie die Infektion verschiedener Wirtszellen und humaner Lungengewebsexplantate untersucht. Ein weiterer, wichtiger Aspekt dieser Arbeit war die Modulation der proinflammatorischen Antwort von Wirtszellen durch ProA. Da bisher nur sehr wenige Proteasen von *L. pneumophila* näher charakterisiert sind, wurden auch phänotypische Untersuchungen der Proteasen PepN und LpC_0267 durchgeführt.

6.1 Optimierung von Produktion und Reinigung von ProA sowie erste Versuche zur Kristallisation

Die Rolle von ProA bei der Virulenz von *L. pneumophila* konnte bislang nicht eindeutig geklärt werden. Einen möglichen Hinweis auf ihre Funktionsweise könnte die Kristallstruktur der Protease geben, die bisher nicht gelöst wurde. ProA weist zwar große Homologien zur Elastase LasB von *P. aeruginosa* und Thermolysin von *B. thermoproteolyticus* auf, jedoch konnte z.B. in Untersuchungen mit künstlichen, fluoreszierenden

6 Diskussion

Substraten ein gänzlich anderes Spaltungsprofil für die Protease als bei Thermolysin nachgewiesen werden (Black et al., 1990, Poras et al., 2012). Für ein besseres Verständnis der Wirkungsweise des meist sezernierten Proteins von *L. pneumophila* und in Hinblick auf die Identifizierung möglicher Targets sowie der Entwicklung von Inhibitoren, sollten im Rahmen dieser Arbeit die Produktion und Reinigung von ProA optimiert sowie erste Kristallisationsversuche durchgeführt werden. Mit dem Ziel, möglichst große Mengen an reinem Protein zu gewinnen, wurden dafür verschiedene Ansätze getestet. Da ProA von *L. pneumophila* selbst bereits in größeren Mengen produziert und in das Medium sezerniert wird, war eine Herangehensweise die Isolierung von nativem Protein (Abb. 6.1).

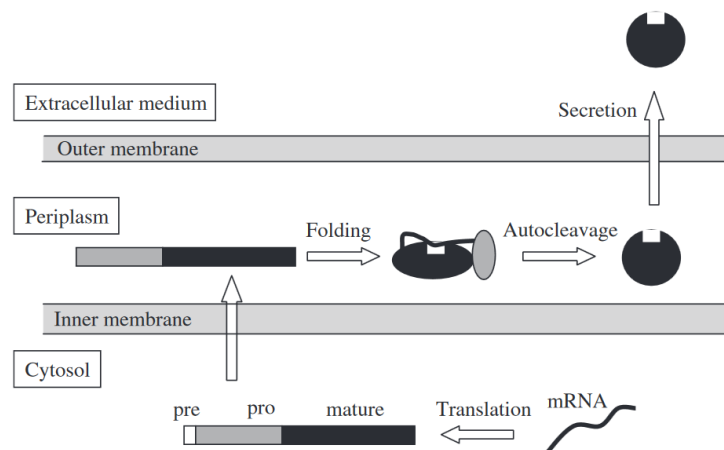


Abbildung 6.1: Schema der ProA-Sekretion an Hand der Thermolysin-ähnlichen Proteasen. Nach der Translation besteht das Präprotein aus einem Signalpeptid (weiß), dem Propeptid (grau) und der Sequenz, die später die reife Protease bildet (schwarz). Die Signalsequenz wird beim Transport über die innere Membran abgespalten. Das Propeptid dient als intramolekulares Chaperon und unterstützt die korrekte Faltung der unreifen Protease im Periplasma. Durch autokatalytische Spaltung wird das Propeptid abgespalten und die Sekretion der reifen, aktiven Protease in das extrazelluläre Medium erfolgt (Inouye et al., 2007).

Der Vorteil dieses Ansatzes ist die Gewinnung der Protease in seiner nativen Konformation, was gerade in Hinblick auf die eventuelle Bestimmung der Kristallstruktur Vorteile bietet. Weiterhin werden umständliche Klonierungsschritte sowie das Anpassen der optimalen Wachstumsbedingungen für die Produktionsstämme umgangen. Mit Hilfe der Ammoniumsulfatfällung konnte natives ProA aus dem Kulturüberstand von *L. pneumophila* ausgefällt und mittels Anionenaustauschchromatographie gereinigt werden. Die durch Western Blot und einem spezifischen Antikörper als ProA-haltig identifizierten Fraktionen waren dabei größtenteils frei von anderen Proteinen.

Insgesamt konnten mit dieser Methode aus 1 L Kulturüberstand ca. 1 mg reines ProA isoliert werden. Mit Hilfe des Azocasein-Assays wurde weiterhin die Aktivität der isolierten Protease bestätigt und Erkenntnisse für den Einsatz in weiterführenden Untersuchungen gewonnen. Die native Isolierung von ProA war erfolgreich, da reines, aktives Protein gewonnen werden konnte, welches für die weitere Untersuchung der Protease benötigt wurde. Jedoch waren die erhaltenen Mengen nicht ausreichend für die Kristallisation von ProA. Für einen Kristallisationsansatz sollte die höchstmögliche Konzentration eines Proteins eingesetzt werden, bei der noch keine Präzipitation stattfindet. Üblicherweise liegt diese zwischen 2 mg/mL und 50 mg/mL (Dessau and Modis, 2011). Für eine höhere Ausbeute an nativem ProA müsste *L. pneumophila* somit in einem viel größerem Maßstab kultiviert werden. Jedoch sollte dieses Vorgehen bei einem humanpathogenen S2-Organismus möglichst vermieden werden, da die Erhöhung der Kulturmenge auch immer mit einer Steigerung des Infektionsrisikos einhergeht.

Für eine höhere Ausbeute an Protein und eine gezieltere Produktion in *E. coli* wurde das *proA*-Gen daher in einen Expressionsvektor eingebracht. Dafür wurden unterschiedliche Expressionssysteme und Produktionsbedingungen getestet (siehe Tabelle 5.1). Als vielversprechend stellte sich die Produktion mit dem Expressionsplasmid pET22b(+) in *E. coli* BL21 heraus. Optimale Produktionsergebnisse konnten in TB-Medium bei Induktion mit α -Lactose und Inkubation bei 30 °C erzielt werden. Der Vergleich der Reinigung von Kulturüberstand und der periplasmatischen Fraktion (PPF) über Affinitätschromatographie mit Protino® Ni-TED Tropfsäulen zeigte, dass reines, rekombinantes ProA aus der PPF isoliert werden konnte. Im Gegensatz zur Reinigung aus dem Kulturüberstand konnten in den ProA-haltigen Fraktionen keine anderen Proteine nachgewiesen werden. Die erzielte Ausbeute lag bei ca. 800 µg reinem, rekombinantem ProA aus 500 mL Kultur. Damit konnte eine größere Menge an reinem Protein gewonnen werden als bei der nativen Isolation. Jedoch zeigte sich, dass auch Degradationsprodukte der Protease isoliert wurden. Da die Reinigung bei Raumtemperatur durchgeführt wurde, war das Auftreten solcher Abbauprodukte bei Produktion einer aktiven Protease jedoch zu erwarten. Bei Anpassung der Produktion auf einen größeren Maßstab (2 L) und gleichzeitiger Erhöhung der Proteinkonzentration waren die Auswirkungen der Selbstdegradation von ProA besonders deutlich zu sehen, obwohl die Reinigung hier bei einer niedrigeren Temperatur (15 °C) durchgeführt wurde.

6 Diskussion

Da die Degradationsprodukte bei der Kristallisation möglicherweise stören können, wurden weitere Reinigungsschritte an die Affinitätschromatographie angeschlossen. Bei einer direkt auf die IMAC folgenden Gelpermeationschromatographie wurde nach massenspektrometrische Analysen eine Anhäufung des Propeptids von ProA in den verschiedenen Fraktionen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Das Propeptid wurde bei der rekombinanten Produktion zwar korrekt abgespalten, blieb aber während der Gelfiltration anscheinend trotzdem mit der reifen Protease assoziiert. Dies ist nicht untypisch für Proteasen der Thermolysin-Familie. Für Vibriolysin aus *Vibrio vulnificus* konnte bereits gezeigt werden, dass das separat exprimierte Propeptid stark mit der katalytischen Domäne interagiert und einen inhibitorischen Effekt auf die Aktivität der reifen Protease hat (Gao et al., 2010). Daher wurde im Anschluss an die IMAC zunächst eine hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) durchgeführt, welche sich in früheren Versuchen bei der Reinigung von rekombinantem Thermolysin als vorteilhaft erwiesen hatte (Inouye et al., 2006). Mittels HIC konnte die Menge der Degradationsprodukte von ProA reduziert werden. Weiterhin war das Propeptid nach Elution nicht mehr in den Fraktionen nachweisbar. Im Anschluss wurde mit den ProA-haltigen Fraktionen eine Gelpermeationschromatographie (GPC) durchgeführt. Dadurch konnte die Menge der niedermolekularen Degradationsprodukte im Vergleich zur HIC deutlich reduziert werden. Die Verwendung von 10 mM EDTA im verwendeten Puffer erwies sich als vorteilhaft gegenüber einer niedrigeren EDTA-Konzentration oder dem Einsatz eines EDTA-freien Puffers. So konnte die Elution der Protease-haltigen Fraktionen in einem schärferen Peak erfolgen. Die erhaltene Ausbeute lag nach der GPC bei 3-5 mg aus 2 L Kultur. Durch die native Isolierung aus *L. pneumophila* konnten dagegen nur ca. 1 mg/L gewonnen werden. Somit wurde durch die rekombinante Produktion und Reinigung eine deutlich größere Menge an reinem Protein isoliert.

In Bezug auf die zukünftige Optimierung der Produktion und Reinigung von ProA sollte beachtet werden, dass die potentiell mögliche Ausbeute weiterhin optimiert werden kann. So wird ein Teil des produzierten ProA-Proteins sezerniert und könnte mittels Ammoniumsulfatfällung und weiterer, chromatographischer Reinigung aus dem Kulturüberstand isoliert werden. Möglicherweise würde hier ein Reinigungsschritt entfallen, da sich das Propeptid nach der Sekretion in das umgebende Medium von der reifen Protease trennen, bzw. von ProA selbst degradiert würde (Kessler et al., 1998). Ein Nachteil bei der Produktion einer aktiven Protease ist das Auftreten einer großen Menge an Degradationsprodukten bei Zunahme der Proteinkonzentration. Durch Zu-

gabe von Komplexbildnern wie EDTA und Lagerung des Proteins bei -20 °C zwischen den einzelnen Reinigungsschritten sowie Durchführung der Reinigung bei niedrigeren Temperaturen kann die Aktivität der Protease zwar reduziert, jedoch nicht vollständig unterbunden werden. Durch Inaktivierung der Proteaseaktivität könnte die Bildung von Aggregaten oder eine mögliche Interaktion mit der Matrix unterbunden werden.

In weiteren Experimenten, auf die in dieser Arbeit nicht näher eingegangen wurde, wurde eine inaktive Variante von ProA produziert. Moffat et al. zeigten, dass durch Ersetzen des katalytischen Glutamats an Position 378 durch Asparagin die proteolytische Aktivität von ProA unterbunden werden kann (Moffat et al., 1994a). Rekombinant konnte die inaktive Protease zwar in großen Mengen produziert werden, jedoch lag das Protein absolut unlöslich in sogenannten *Inclusion bodies* im Zellpellet vor. In *L. pneumophila* selbst führte die Inaktivierung zu einer drastisch reduzierten Produktion von ProA. Auch hier war ein Großteil der Protease als Präproenzym im Zellpellet lokalisiert. Der Austausch der katalytischen Aminosäure führte also zu einer deutlich herabgesetzten Sekretion. Ausgelöst werden könnte dies z.B. über eine Verdeckung des Signalpeptids oder der Steigerung der Hydrophobizität durch Fehlfaltung des Proteins. Weiterhin ist eine Autoprozessierung der Protease nicht mehr möglich, was die Sekretion zusätzlich beeinflussen könnte. Ähnliche Ergebnisse konnten bereits für die Elastase LasB aus *P. aeruginosa* gezeigt werden (McIver et al., 1993). Eine Produktion von inaktivem ProA ist somit nicht möglich.

Mit gereinigtem, rekombinantem ProA wurden erste Kristallisationstests durchgeführt. Eine Pilzkontamination des Pipettiersystems führte zu einem Hyphenwachstum in einigen Testansätzen. Gerade in diesen Ansätzen konnten vermehrt Kristalle beobachtet werden, da die Hyphen als Kristallisationskeime fungieren können. Jedoch sind diese Bedingungen in keinster Weise reproduzierbar. Vielversprechend waren die Ansätze mit 9,4 mg/mL ProA-His₆ unter Fällung mit 0,1 M Tris, 40 % (v/v) PEG 300 und 5 % (w/v) PEG 1.000 (JSCG Core III) sowie 4,9 mg/mL ProA-His₆ unter Fällung mit 0,07 M Natriumacetat, pH 4,6, 30 % (v/v) Glycerin und 5,6 % (w/v) PEG 4.000 (Cryos). Bei beiden Ansätzen lagen keine Kontaminationen vor und es konnten viele kleinere Kristalle beobachtet werden, die unter kreuzpolarisiertem Licht nicht leuchteten. Dies kann ein Hinweis auf Proteinkristalle sein. Für eine weitere Analyse waren die Kristalle jedoch zu klein, was auf die Proteaseaktivität von ProA zurückzuführen sein könnte. Bei Inkubation der Screens bei 20 °C über einen längeren Zeitraum könnte sich ProA selbst abgebaut haben und kleinere Degradationsprodukte wurden

kristallisiert. Hierbei wäre besonders die lange Inkubationsdauer der Screens bis zur Entstehung erster Kristalle nachteilig. Jedoch konnten mit Hilfe dieser Tests auch erste Hinweise auf günstige Kristallisationsbedingungen gewonnen werden. Die Verwendung von PEG als Präzipitant schien generell vorteilhaft zu sein, da auch in einigen weiteren Ansätzen eine Kristallbildung bei Einsatz von PEG beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt). PEG ist ein effektives und häufig verwendetes Präzipitant und wurde auch schon erfolgreich für die Kristallisation der *Pseudomonas*-Elastase LasB eingesetzt (McPherson, 1976, Thayer et al., 1991). Diese Bedingungen müssten in weiteren Ansätzen erneut getestet werden. Zum Vergleich könnte dafür rekombinantes ProA mit abspaltbarem His₆ eingesetzt werden, welches die Kristallisation möglicherweise stören könnte. Der Einfluss von His-Tags bei der Kristallisation auf die native Struktur des Proteins ist jedoch umstritten. Bisher berichten nur wenige Arbeiten von Auswirkungen des His-Tags auf die Faltung. Tatsächlich kann der Tag auch hilfreich oder sogar notwendig für die Kristallisation sein (Klose et al., 2004, Carson et al., 2007). In dieser Arbeit konnte ProA nativ aus dem Kulturüberstand von *L. pneumophila* isoliert und die rekombinante Produktion und Reinigung der Protease optimiert werden. Erste Kristallisationsversuche ergaben Hinweise auf die benötigten Kristallisationsbedingungen hinsichtlich der Bestimmung der Kristallstruktur von ProA.

6.2 Einfluss von ProA auf das Wachstumsverhalten und das Sekretom

In dieser Arbeit konnte erfolgreich eine *proA*-defiziente Mutante hergestellt werden. Für den weiteren Einsatz in verschiedenen Experimenten war es wichtig, das Wachstumsverhalten der Deletionsmutante zu überprüfen. In YEB-Medium konnte dabei (in Bezug auf die gemessene OD₆₀₀) kein signifikanter Unterschied zum Wachstumsverhalten des Wildtyps festgestellt werden. Das Fehlen der Protease scheint somit nicht notwendig für das Wachstum in nährstoffreichem Medium zu sein. Alternativ produziert *L. pneumophila* eine Vielzahl weiterer Proteasen, die den Verlust von ProA, in Bezug auf die Gewinnung von Aminosäuren aus Peptiden, möglicherweise ersetzen können. Weiterhin enthält das YEB-Medium Hefeextrakt, in welchem durchaus noch aktive Proteasen vorkommen können (Campbell et al., 1995).

Auch die gemessene Proteinkonzentration im Kulturüberstand von *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ zeigte keine Differenzen zum Wildtyp, obwohl das meist sezernierte

Protein dort nicht mehr vorhanden war. Zunächst wurde daher vermutet, dass dieser Verlust durch die höhere Produktion anderer Proteine ausgeglichen wird. Der Vergleich der Proteaseaktivitäten im Kulturüberstand der *proA*-Deletionsmutante und des Wildtyps zeigte, dass ProA den größten Anteil an der extrazellulären Proteaseaktivität hat. Die in der *proA*-defizienten Mutante gemessenen Proteaseaktivitäten waren im Vergleich zum Wildtyp nur minimal.

In CDM konnte dagegen ein leicht verzögertes Eintreten von *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ in die log-Phase beobachtet werden. Vermutlich spielt ProA daher beim Wachstum in CDM eine Rolle. Eine Messung der extrazellulären Proteaseaktivität sowie die Betrachtung des Sekretionsprofils von *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ zeigten jedoch, dass ProA auch im Wildtyp bei Kultivierung in CDM nur in sehr geringen Mengen vorkommt. Normalerweise sollte die Produktion extrazellulärer Proteasen in nährstoffärmeren Umgebungen erhöht werden (Whooley et al., 1983). Jedoch konnte auch schon für die *P. aeruginosa*-Elastase LasB eine drastische Reduktion in Minimalmedium nachgewiesen werden (Scott et al., 2013). Dies könnte damit zusammenhängen, dass LasB ein *Quorum sensing* (QS)-reguliertes Protein ist, sodass die reduzierte Produktion wahrscheinlich mit der geringen Zelldichte in dem Medium zusammenhängt. Auch Legionellen erreichen in CDM deutlich geringere optische Dichten als bei Kultivierung in nährstoffreichem Medium. So erreichte der Wildtyp maximal eine OD₆₀₀ von ca. 1,9.

In *L. pneumophila* ist unter anderem das *lqs* (*Legionella quorum sensing*)-System für das QS verantwortlich. Das *lqs*-System erkennt das Signalmolekül LAI-1 und kontrolliert, neben anderen Zweikomponentensystemen, den Übergang von der replikativen in die transmissive Wachstumsphase über die regulatorische Kaskade RsmY/RsmZ-CsrA (Spirig et al., 2008, Tiaden et al., 2007, Schell et al., 2016). Einen Hinweis auf die QS-vermittelte ProA-Expression könnte der Stamm *L. longbeachae* geben. Für diesen wurden keine *lqs*-Gene gefunden. Zusätzlich zeigt *L. longbeachae* keine extrazelluläre Proteaseaktivität. Sequenzvergleiche mit dem Programm BLAST ergaben weiterhin keine Mutationen des *L. longbeachae*-ProAs im Zink-Bindemotif oder des für die Aktivität verantwortlichen Glu³⁷⁸. Durch das Fehlen der *lqs*-Gene wird in *L. longbeachae* höchstwahrscheinlich die Produktion von LAI-1 durch LqsA unterbunden. Es könnte jedoch sein, dass freies LAI-1 anderer Legionellen weiterhin detektiert werden kann. Um eine mögliche Abhängigkeit der ProA-Produktion von LAI-1-vermitteltem QS zu untersuchen, könnte zellfreier Kulturüberstand von *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$

6 Diskussion

mit *L. longbeachae* inkubiert werden. Dabei könnte analysiert werden, ob LAI-1 von *L. pneumophila* Corby von *L. longbeachae* detektiert werden kann. Führt dies in weiterer Folge zur ProA-Expression in *L. longbeachae*, wäre ein Zusammenhang bestätigt. Tiaden et al. (2008) zeigten, dass über das Lqs-System die Expression einiger Virulenz-assoziiierter Gene reguliert wird. So sind in einer *lqs*-defizienten Mutante unter anderem Gene verschiedener Dot/Icm-Substrate wie LidA und SidC sowie Gene im Zusammenhang mit dem Aufbau der Flagelle reprimiert. Für das *proA*-Gen konnte jedoch bisher keine Reduktion in der Expression festgestellt werden.

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die *proA*-Expression von dem alternativen Sigmafaktor RpoS positiv beeinflusst wird. Dieser spielt besonders beim Eintritt der Bakterien in die stationäre Phase eine Rolle und kontrolliert die Expression vieler Virulenzgene wie z.B. *mip*. Möglicherweise haben die veränderten Wachstumsbedingungen in CDM einen Einfluss auf die *rpoS*-Expression, was wiederum zu einer verminderten Expression RpoS-abhängiger Gene führt. In Western Blot-Analysen wurde daher auch das Vorkommen von Mip im CDM-Sekretom überprüft. Eine Reduktion im Vergleich zum Wildtyp-Sekretom nach Kultivierung in YEB konnte hierbei nicht festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Dies könnte bedeuten, dass in CDM keine Veränderung der RpoS-vermittelten Expression vorliegt. Um dies abschließend zu klären müssten allerdings noch weitergehende Untersuchungen mit weiteren RpoS-abhängigen Genen durchgeführt werden.

In dieser Arbeit wurde des Weiteren untersucht, ob die Zugabe von Proteinen oder Protein-haltigen Zusätzen zu einer erhöhten Produktion von ProA in CDM führt. Jedoch führte weder eine Inkubation mit Casein, noch mit THP-1- oder Lungenproteom zu einer vermehrten ProA-Produktion in *L. pneumophila* Corby WT. Dies lässt darauf schließen, dass die ProA-Expression nicht abhängig von dem Vorkommen extrazellulärer Proteine ist. Ähnliche Ergebnisse konnten auch schon in Versuchen mit LasB aus *P. aeruginosa* gezeigt werden. Auch hier war das Vorkommen von extrazellulärem Protein für die Induktion der Elastase-Produktion nicht notwendig. Weiterhin wurde die Produktion auch nicht durch freie Aminosäuren reprimiert (Jensen et al., 1980). Die effiziente Produktion von LasB ist stark Calcium-abhängig. Jedoch ergab das Wachstum in Ca^{2+} -freiem Medium keinen veränderten Nachweis von ProA im CDM-Sekretom. Interessanterweise zeigte das Sekretom einer Mutante von *L. pneumophila* Corby, die nur inaktives ProA bildet, ein ähnliches Sekretomprofil wie bei Inkubation des Wildtyps in CDM. In dem verwendeten CDM war kein zusätzliches Zn^{2+} enthalten. Mög-

licherweise führte dies zu einer stark reduzierten Bildung von aktivem ProA. Somit könnte die Expression von *proA* auch von dem Vorkommen von aktivem ProA selbst abhängen. Diese Möglichkeit müsste in weiterführenden Proteom- und Transkriptomstudien eingehender untersucht werden.

Bei Kultivierung in YEB-Medium ließen sich im Gegensatz zur Kultivierung in CDM eindeutige Unterschiede in den Sekretionsprofilen von *L. pneumophila* Corby WT und *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ feststellen. Eine naheliegende Vermutung wäre, dass durch den Verlust des meist sezernierten Proteins in der *proA*-Deletionsmutante die Expression oder Sekretion anderer Proteine wie z.B. Proteasen erhöht würde, um diesen auszugleichen. Jedoch zeigte die massenspektrometrische Analyse, dass im Sekretom von *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ kein einziges Protein vermehrt vorlag. Stattdessen konnten sehr viele Proteine nachgewiesen werden, die im Vergleich zum Wildtyp vermindert oder gar nicht vorkamen. Viele dieser Proteine sind in den Metabolismus von *L. pneumophila* involviert. Daher wurde zunächst vermutet, dass es bei der Präparation des Sekretoms zu einer mechanischen Zelllyse des Wildtyps gekommen war. Ein Vergleich der koloniebildenden Einheiten vor und nach der Zentrifugation zeigte jedoch keine Differenzen, weshalb eine Zelllyse ausgeschlossen werden konnte. Weiterhin deckte sich die Sekretomzusammensetzung des Wildtyps auch mit den Ergebnissen einer früheren Sekretomstudie mit *L. pneumophila* Philadelphia (Galka et al., 2008). So wurden auch dort Proteine der inneren Membran (z.B. IcmE (DotG)) oder des Cytoplasmas (z.B. PepO) im Sekretom detektiert. Anhand der verringerten oder nicht vorkommenden Proteine im Sekretom der *proA*-negativen Mutante lässt sich jedoch nur schwer feststellen, welche Rolle ProA bei der Zusammensetzung des Sekretoms spielt. Ein konkreter Zusammenhang der verschiedenen Proteine konnte nicht detektiert werden. Eine Vermutung wäre, dass ProA extrazelluläre Faktoren aktiviert oder inaktiviert, die im Zusammenhang mit der Sekretion oder Prozession von Proteinen stehen. Ein Beispiel für zwei direkt von ProA aktivierte Proteine sind die Phospholipase A PlaC und die Lysophospholipase PlaA, die möglicherweise auch Einfluss auf die Zusammensetzung des Sekretoms nehmen könnten (Lang et al., 2012, 2017). Ebenfalls sind verschiedene Peptidasen im Sekretom der *proA*-Deletionsmutante vermindert, die vielleicht eine Rolle bei der Aktivierung anderer Faktoren spielen könnten. Auch das Proteinexport-Protein SecB ist weniger vorhanden. Dieses ist Teil des Sec-Systems, welches Proteine über die Zytoplasmamembran transportiert und dafür sorgt, dass präsekretorische Proteine ungefaltet die innere Membran passieren. Ein reduziertes Auf-

6 Diskussion

treten könnte sich massiv auf die Zusammensetzung des Sekretoms auswirken, da insbesondere die Typ II-Sekretion oft Sec-abhängig ist (Green and Meccas, 2016). Jedoch lässt ein verringertes Vorkommen im Sekretom keine Rückschlüsse auf das intrazelluläre Vorkommen dieses Proteins zu. Ähnliches gilt für die Chaperonine GroEL und GroES, welche ebenfalls im *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ -Sekretom reduziert vorlagen. Diese helfen bei der Faltung zytosolischer Proteine (Martin, 1998). Allerdings wird für GroEL (auch als HtpB bezeichnet) außerdem eine extrazelluläre Aktivität vermutet. So ist das Chaperonin auch auf der Zelloberfläche lokalisiert und interagiert mit Rezeptoren von Wirtszellen. Weiterhin vermittelt es die Anheftung an und die Invasion in die Wirtszelle (Garduño et al., 2011). Damit würde sich das GroEL in eine Reihe verschiedener multifunktionaler, sogenannter *moonlighting*-Proteine, eingliedern. In weiterführenden Untersuchungen wäre es interessant zu schauen, ob auch die intrazellulären, bzw. periplasmatischen Konzentrationen von SecB, GroEL und GroES in der *proA*-defizienten Mutante verändert sind.

Des Weiteren könnte ProA Faktoren prozessieren, die wichtig für die Expression oder Transkription in *L. pneumophila* sind. Dazu müssten diese Faktoren jedoch extrazellulär vorliegen und anschließend in die Zelle gelangen. Denkbar wäre hier der Einfluss auf Transkriptionsfaktoren, die auf metabolische Signale wie z.B. Aminosäuren reagieren und spezifisch Zielgene aktivieren oder inaktivieren (Berthoumieux et al., 2013).

Im Sekretom der *proA*-Deletionsmutante war, im Vergleich zum Wildtyp-Sekretom, weiterhin die Katalase/Peroxidase KatG 20,67-fach weniger vorhanden. Die Kultivierung auf bzw. in H_2O_2 -versetztem Medium wirkte sich dabei jedoch nicht negativ auf das Wachstum von *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ aus. Dies könnte zum Einen daran liegen, dass KatG durchaus noch im Sekretom präsent ist. Zum Anderen besitzt *L. pneumophila* die zweite bifunktionale Katalase/Peroxidase KatB. Diese ist in der exponentiellen Wachstumsphase die dominante Katalase/Peroxidase und bei Inkubation der Legionellen in H_2O_2 -versetztem Medium somit vermutlich von größerer Bedeutung als KatG, da dieses sofort auf die Bakterien einwirkt.

KatG ist dagegen hauptsächlich in der stationären Wachstumsphase von Bedeutung. Dies zeigte sich auch im *Stationary Phase Survival* von *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$. Durch Bestimmung der cfu/mL konnte für die Deletionsmutante ein signifikant schnelleres Absterben in der stationären Phase im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden. In der stationären Wachstumsphase reichern sich außerhalb der Zelle vermehrt

H₂O₂-Moleküle an, die durch KatG abgebaut werden können. Ein vermindertes Vorkommen der Katalase/Peroxidase im Sekretom der *proA*-defizienten Mutante kann somit Auswirkungen auf das Überleben in dieser Wachstumsphase haben. Zum Vergleich könnten in weiterführenden Untersuchungen stationären Kulturen mit H₂O₂ versetzt und das Überleben von Wildtyp und *proA*-defizienter Mutante über die *cfu* bestimmt werden. Allerdings ist KatG hauptsächlich im Periplasma von *L. pneumophila* lokalisiert. Das reduzierte Vorkommen wurde in dieser Arbeit jedoch nur für das Sekretom bestimmt. Daher können aktuell keine Aussagen darüber getroffen werden, ob KatG generell weniger in der *proA*-Deletionsmutante vorkommt und ob das Defizit im *Stationary Phase Survival* allein auf dieses Enzym zurückzuführen ist. So konnte schon früh festgestellt werden, dass der Verlust von Proteasen zu einem drastisch reduzierten Überleben der Bakterien in der stationären Phase führen kann (Reeve et al., 1984). Dabei scheint die Regulation durch Proteolyse besonders wichtig bei nicht wachsenden Zellen zu sein. Innerhalb der Bakterienzelle kommt es in der stationären Phase zur Akkumulation verschiedener Proteine. Die zytosolische Protease ClpP aus *E. coli* reguliert z.B. durch Proteolyse das Vorkommen dieser Proteine (Weichart et al., 2003). Eine ähnliche Funktion für extrazelluläre Proteasen wäre denkbar, da sich auch außerhalb der Zelle Faktoren anhäufen, die in hohen Konzentrationen auch toxisch auf das Bakterium wirken können. Gleichzeitig können so in einem immer nährstoffärmer werdenden Medium weiterhin Nährstoffe gewonnen werden. Gerade für Legionellen, die Aminosäuren als Hauptenergiequelle nutzen, könnte dies von essentieller Bedeutung sein. In jedem Fall lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass der Verlust von *proA* zu einer verminderten Überlebensfähigkeit in der späten stationären Phase führt. Weiterhin ist zu vermuten, dass diese Umstände auch mit dem veränderten Sekretom von *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ im Zusammenhang stehen.

Ein weiteres Enzym, dass im Sekretom der *proA*-defizienten Mutante im Vergleich zum Wildtyp-Sekretom 1031,12-fach reduziert vorlag, war die Tyrosin-Phosphatase LpC_3106. Eine Deletionsmutante des homologen *lppA* aus *L. pneumophila* Phil. JR32 zeigte in früheren Studien Wachstumsdefizite in Anwesenheit von Phytat. Phytat hat eine bakteriostatische Wirkung, da es wichtige Metallionen wie Zn²⁺ oder Mn²⁺ chelatieren kann. LppA ist in der Lage, Phytat durch Hydrolyse abzubauen (Weber et al., 2014). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit das Wachstum der *proA*-negativen Mutante in Anwesenheit von Phytat untersucht. Hier konnte unter Phytat-Zusatz ein signifikant besseres Überleben der *proA*-Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp

6 Diskussion

verzeichnet werden. Somit scheint das geringere Vorkommen der Tyrosin-Phosphatase nicht ausschlaggebend zu sein, was jedoch das verbesserte Überleben unter diesen Bedingungen nicht erklären würde. Weber et al. (2014) zeigten auch, dass die Zugabe von Supplementen wie Fe^{3+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} und Ca^{2+} der Wachstumshemmung entgegenwirken kann. Vielleicht werden in der *proA*-Deletionsmutante mehr dieser Ionen bereitgestellt oder verwertet, sodass der chelatierende Effekt von Phytat nicht mehr ins Gewicht fällt. Weiterhin scheint *L. pneumophila* Corby generell etwas resistenter gegen Phytat zu sein als *L. pneumophila* Phil. JR32, da eine signifikante Reduktion der OD_{600} erst ab einer Konzentration von 15 mM detektiert werden konnte. Bei *L. pneumophila* Phil. JR32 konnte dieser Effekt schon ab 4 mM Phytat beobachtet werden. Weber et al. (2014) vermuteten jedoch auch, dass Phytat bei der extrazellulären Vermehrung von *L. pneumophila* unter Laborbedingungen eher eine geringere Rolle spielt und hauptsächlich bei der intrazellulären Replikation in Amöben von Bedeutung ist. Entsprechend konnte für die *lppA*-defiziente Mutante ein Defekt in der intrazellulären Vermehrung in Phytat-beladenen *A. castellanii* festgestellt werden (Weber et al., 2014). Dies konnte in dieser Arbeit auch für die *proA*-Deletionsmutante gezeigt werden. Nach 24 h war ein signifikanter Unterschied in der Vermehrung im Vergleich zum Wildtyp feststellbar, der bei Infektionsversuchen ohne Phytat nicht detektiert wurde. Das geringere Vorkommen der Tyrosin-Phosphatase hat demnach bei der intrazellulären Vermehrung größere Auswirkungen. Dies könnte auf das geringere Angebot an Mikronährstoffen innerhalb der Wirtszelle zurückzuführen sein. Eukaryotische Zellen sind in der Lage, das dem intrazellulären Pathogen zur Verfügung stehende Mikronährstoffangebot aktiv zu reduzieren. Dieser Vorgang wird als *nutritional immunity* bezeichnet und konnte bereits für Eisen, Zink und Mangan gezeigt werden (Weinberg, 1975, Corbin et al., 2008, Kehl-Fie and Skaar, 2010). Demnach verändern Makrophagen die Expression von zytosolischem ZIP und ZnT. Das Transportsystem ist für die Aufnahme von Zink in bzw. Export aus der Zelle heraus verantwortlich. Weiterhin kommt es zu einer verminderten ZIP8-Expression, was zu einer verringerten Konzentration von lysosomalem Zink führt. Außerdem wird die vermehrte Expression von Nramp1 induziert, welches Eisen und Mangan aus dem Lysosom herauspumpt (Kehl-Fie and Skaar, 2010). Nramp konnte auch in der Amöbe *D. discoideum* als ein die *Legionella*-Infektion beeinflussender Faktor nachgewiesen werden (Peracino et al., 2013, Bozzaro et al., 2013). Somit könnte *nutritional immunity* auch ein Abwehrmechanismus von Amöben sein, gegen den ProA-abhängige Faktoren wie LppA wirken.

Für eine schlechtere Phytat-Resistenz in *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ spricht weiterhin das verringerte Vorkommen des Proteins IolD im Sekretom. Dieses ist, wie die Tyrosin-Phosphatase, in die Verstoffwechselung von Phytat involviert (Manske et al., 2016). IolD kommt im Vergleich zum Wildtyp-Sekretom 9,00-fach reduziert im Überstand von *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ vor. Somit könnte das veränderte Sekretom von *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ verantwortlich für das Vermehrungsdefizit in Phytat-beladenen *A. castellanii* sein. In zukünftigen Versuchen könnte getestet werden, ob dieses Vermehrungsdefizit auch in *D. discoideum* auftritt. Diese weisen natürlicherweise eine hohe, intrazelluläre Phytat-Konzentration auf (Weber et al., 2014). Weiterhin könnten Versuche mit *nramp*-defizienten Mutanten von *D. discoideum* durchgeführt werden.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass der Verlust von ProA eine massive Veränderung des Sekretoms verursacht und diese sich besonders auf das Überleben von *L. pneumophila* in der Umwelt auswirkt.

6.3 ProA und PepN beeinflussen die *Sliding Motility*

Sliding motility ist eine Flagellen- und Pili-unabhängige Form der Oberflächentranslokation, die mit der Sekretion eines speziellen Tensidfilms einhergeht. Außer *L. pneumophila* nutzen z.B. *P. aeruginosa*, *S. marcescens* und *V. cholerae* diese Art der passiven Fortbewegung (Matsuyama et al., 1995, Brown and Hase, 2001, Murray and Kazmierczak, 2008). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch Proteasen eine Rolle bei der *Sliding Motility* von *L. pneumophila* spielen. So konnte für ProA ein Effekt auf die *Sliding Motility* nachgewiesen werden. Dieser betraf jedoch nicht die Ausbreitung der Kolonie, sondern vielmehr die Ausbreitung des Tensidfilms. Im Vergleich zum Wildtyp wies dieser eine deutlich reduzierte Fläche sowie eine phänotypisch unregelmäßige, fächerartige Struktur auf. Die verringerte Tensidfilmfläche könnte der reduzierten Produktion des *Legionella*-Surfactants oder aber dessen verminderten Sekretion zugrunde liegen. Da *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ eine deutlich verändertes Sekretom im Vergleich zum Wildtyp aufweist, wäre ein Einfluss auf die *Surfactant*-Sekretion nicht unwahrscheinlich. Einen weiteren Hinweis auf eine veränderte Tensidfilm-Zusammensetzung gibt auch seine sich vom Wildtyp unterscheidende Struktur.

6 Diskussion

Für die *pepN*-Deletionsmutante wurde nach 21 d Inkubation eine signifikant vergrößerte Koloniefäche im Vergleich zum Wildtyp festgestellt. Das Fehlen von PepN scheint also die Ausbreitung von *L. pneumophila* auf festen Oberflächen zu begünstigen. Eine erhöhte *Sliding Motility* in *L. pneumophila* konnte auch schon für eine *pilY1*-Deletionsmutante beobachtet werden. Allerdings wurde hier gleichzeitig eine stärkere Tensidfilm-Sekretion detektiert (Hoppe, 2017). Für die *pepN*-negative Mutante wurde jedoch keine vergrößerte Tensidfilmfläche nachgewiesen, weshalb eine vermehrte Sekretion eines *Biosurfactants* vermutlich ausgeschlossen werden kann. Es wäre aber möglich, dass PepN einen Einfluss auf die Zusammensetzung des Tensidfilms hat.

Tenside sind strukturell diverse, amphipatischen Moleküle, die die Oberflächen- und Grenzflächenspannung, wie sie z.B. auf Agarplatten vorkommt, reduzieren (Stewart et al., 2009). Zu ihnen gehören unter anderem Fettsäuren, neutrale Lipide, Phospholipide, Glykolipide, Glykopeptidolipide, Lipopeptide und Lipoproteine (Youssef et al., 2004, Nitschke et al., 2005, Mukherjee et al., 2006, Berti et al., 2007). Glykopeptidolipide in der Zellhülle von *Mycobacterium avium* können z.B. die Bakterien-Oberfläche hydrophober machen und dadurch Interaktionen mit dem Agar reduzieren, was zu einer verbesserten Ausbreitung der Kolonie führt (Martinez et al., 1999). Bei *P. aeruginosa* besteht der sezernierte Tensidfilm hauptsächlich aus Rhamnolipiden (Glykolipide bestehend aus L-Rhamnose und 3-Hydroxy-Alkansäuren). Neben der Fähigkeit, die Oberflächenspannung zu reduzieren, können sie, ähnlich zu *M. avium*, auch die Hydrophobizität der Zelloberfläche erhöhen und dadurch die Bindung an verschiedene Kohlenstoffquellen, wie Alkane, verbessern (Caiazza et al., 2005). Ein wichtiger Bestandteil des Tensidfilms von *S. marcescens* ist das Lipopeptid Serrawettin, welches ebenfalls eine Rolle bei der Flagellen-unabhängigen Ausbreitung der Bakterien auf Agarflächen spielt (Li et al., 2005).

In *L. pneumophila* ist die genaue Zusammensetzung des Tensidfilms noch nicht geklärt. In Studien von Stewart et al. (2011) wurden Mutanten isoliert, die diesen *Surfactant*-Film nicht mehr bilden konnten. Mutanten, die ein zur Serrawettin W1-Synthetase aus *S. marcescens* homologes Enzym nicht mehr bilden können, wiesen jedoch keinen Defekt in der Tensidfilmbildung auf. Dies zeigt, dass die *Surfactant*-Produktion und/oder -Sekretion von *L. pneumophila* anderen Mechanismen unterliegt. Unter den Tensidfilm-negativen Mutanten waren zwei Stämme, die Mutationen in Genen von Enzymen des Lipid-Metabolismus trugen. Diese Gene liegen in den Operons *bbcABCDEF* und *bbcGHIJK*. Möglicherweise vermitteln diese Enzyme die Produktion einer

Lipid-Komponente. Ein Einfluss auf die Transkription dieser Gene scheint jedoch, zumindest für ProA, nicht wahrscheinlich. In einem ersten Testexperiment wurde kein Unterschied in der Genexpression im Vergleich zum Wildtyp festgestellt (Daten nicht gezeigt).

In neuesten Studien wurde das Polyketid Legionellol A beschrieben, welches in die *Sliding Motility* von *L. pneumophila* involviert ist und möglicherweise als *Surfactant* dient (Johnston et al., 2016, Tobias et al., 2016). Dieses weist eine Ornithin-ähnliche Struktur auf und steht im Zusammenhang mit einem Polyketid-Synthase-Cluster. Die Deletion eines dieser Gene, einer Ketosynthase, führte zu einem veränderten Metabolom und einem Defekt in der *Sliding Motility*. Möglicherweise beeinflussen ProA und PepN die Polyketid-Synthese. So konnte durch die Sekretomanalyse der *proA*-defizienten Mutante festgestellt werden, dass einige, in die Fettsäuresynthese, bzw. in den Citratzyklus involvierte Enzyme, nicht im Kulturüberstand vorkamen. Dazu gehörten eine Acetyl CoA-Synthetase, eine Succinyl CoA-Synthetase und eine 3-Hydroxyl CoA-Dehydrogenase. Eine Beteiligung dieser Enzyme an der Polyketid-Synthese wäre möglich und müsste in weiteren Studien näher untersucht werden. Jedoch ist zu erwähnen, dass nur das Sekretom von *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ untersucht wurde. Daher kann nicht genau festgestellt werden, ob diese Enzyme auch im Zytosol verringert vorliegen. Nichtsdestotrotz könnten diese Ergebnisse ein erster Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen ProA und der Tensidfilmbildung in *L. pneumophila* sein, zumal diese auch vom T2SS abhängt. So vermuteten McCoy-Simandle et al. (2011), dass dieser zwar TolC-abhängig ausgeschleust wird, die Sekretion oder Synthese des *Surfactants* aber von einem T2SS-sezernierten Effektormolekül und/oder einem aktivierendem Enzym induziert wird. Vermutlich sind hier, ähnlich zur Typ II-abhängigen Virulenz von *L. pneumophila*, mehrere Faktoren von Bedeutung. Eine Rolle von ProA als prozessierendes oder aktivierendes Enzym in dieser vielschichtigen Kaskade wäre somit durchaus wahrscheinlich. Im Gegensatz zu ProA ist PepN vermutlich eher im Zytosol von *L. pneumophila* lokalisiert. Da die *pepN*-negative Mutante eine verbesserte *Sliding Motility* aufwies, wäre eine repressorische Wirkung von PepN auf die Synthese oder Sekretion des *Surfactants* möglich.

In früheren Studien konnte auch schon für Proteasen anderer Spezies eine Beteiligung an der Motilität nachgewiesen werden. So verhindert die Hemagglutinin-Protease (HAP) von *V. cholerae* die Transduktion über semisoliden Oberflächen. Es wird vermutet, dass ein Protease-sensitiver Oberflächenfaktor in diesen Prozess involviert ist

(Brown and Hase, 2001). Für *B. subtilis* konnte gezeigt werden, dass extrazelluläre Proteasen an der *Swarming motility* beteiligt sind (Connelly et al., 2004). Diese Form der Oberflächentranslokation ist zwar Flagellen-abhängig, jedoch benötigt sie auch die Sekretion eines Lipidfilms. Auch hier vermuteten die Autoren, dass die Proteasen mit Oberflächenfaktoren von *B. subtilis* interagieren. Jedoch benötigte es die Deletion aller extrazellulärer Proteasen, um einen nicht-schwärmenden Phänotyp zu generieren. Daher spielt eine einzelne Protease vermutlich keine große Rolle in diesem Prozess. Auch für ProA konnte nur eine Veränderung des Tensidfilm-Phänotyps beobachtet werden, kein genereller Verlust der *Sliding Motility*. *Swarming Motility* wurde in *L. pneumophila* bisher noch nicht näher untersucht. Vermutlich spielt sie eher eine geringere Rolle bei der Ausbreitung der Legionellen. In *V. vulnificus* ist die extrazelluläre Protease VvpE essentiell für die *Swarming Motility*. Auch hier wird vermutet, dass sie Oberflächenproteine spaltet, die zu einer Veränderung der bakteriellen Zellhülle führen. Diese Veränderung der Zellhülle könnte wiederum zu einer verbesserten Zell-Zell- oder Zell-Oberflächen-Interaktion führen. Möglicherweise prozessiert VvpE auch Peptide in funktionelle Signalmoleküle (Kim et al., 2007). Für ProA würde vermutlich eher das zweite Szenario in Frage kommen, da der Verlust des Proteins nicht zu einer veränderten Ausbreitung der Kolonie führte.

Weiterhin bleibt zu erwähnen, dass *Biosurfactants* wichtig für die Bildung, Etablierung und das Verlassen von Biofilmen sind (Davey et al., 2003, Xavier et al., 2011). Somit könnte der Verlust von ProA auch Auswirkungen auf *L. pneumophila*-Biofilme haben, zumal extrazelluläre Proteasen besonders wichtig für das Verlassen solcher Umgebungen sind (Mukherji R and A, 2015). Weiterhin spielen Proteasen bei der proteolytischen Prozessierung von Aggregationsproteinen, die wichtig für die Adhärenz an Oberflächen sowie die interzelluläre Aggregation sind, eine Rolle (Carroll and Mahars-hak, 2013). Für die Aminopeptidase LpC_0267 konnte kein Einfluss auf die *Sliding Motility* beobachtet werden.

6.4 ProA beeinflusst die intrazelluläre Replikation

Der Einfluss von ProA auf die intrazelluläre Replikation von *L. pneumophila* in Wirtszellen wurde schon in früheren Studien untersucht (Szeto and Shuman, 1990, Moffat et al., 1994b, Edelstein et al., 1999, Hales and Shuman, 1999a, Rossier et al., 2008, Tyson et al., 2013). Jedoch führten die Untersuchungen teilweise zu kontroversen Re-

sultaten, weshalb die in dieser Arbeit erstellte *proA*-Deletionsmutante in den Wirtszell-Modellen *A. castellanii*, *V. vermiformis* und in THP-1-Makrophagen einheitlich getestet werden sollte. Interessanterweise zeigte die *proA*-defiziente Mutante in allen Wirtsorganismen 2 h nach Inokulierung eine signifikant reduzierte *cfu*/mL. Ein ähnlicher Effekt wurde auch für die *dotA*-negative Mutante beobachtet. Jedoch kann sich diese, durch den Verlust der Typ IV-abhängigen Sekretion, generell nicht in Wirtszellen etablieren. Ob ProA eine Rolle bei der Etablierung von *L. pneumophila* in der Wirtszelle spielt oder einen Einfluss auf die Adhärenz oder Invasion hat, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Möglicherweise zeigten sich auch hier die Auswirkungen des veränderten Sekretoms von *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$. So ist das GroEL-Protein Hsp60 im Vergleich zum Wildtyp-Sekretom 104,69-fach weniger vorhanden. Dieses ist in Protein-Protein Interaktionen involviert und vermittelt die Invasion in HeLa-Zellen (Garduño et al., 1998). Eventuell kann die *proA*-Deletionsmutante dadurch schlechter an Wirtszellen adhären und die Aufnahme erfolgt verzögert. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass ProA andere Oberflächenfaktoren prozessiert, die eine Rolle bei der Adhärenz oder Invasion spielen. Auch ein Einfluss auf Wirtszellfaktoren wäre denkbar. Für extrazelluläre Proteasen anderer pathogener Bakterien konnten bereits Auswirkungen auf die Invasionsfähigkeit nachgewiesen werden. Ein Beispiel ist die Cystein-Protease SpeB von *Streptococcus pyogenes*. Infektionsversuche mit *speB*-negativen Mutanten in A549-Zellen ergaben eine im Vergleich zum Wildtyp verringerte *cfu* 90 min nach Inokulierung, jedoch keinen Einfluss auf die intrazelluläre Vermehrung. Vermutet wurde eine Rolle von SpeB in der Rezeptor-Liganden-Interaktion bei der Aufnahme von *S. pyogenes* (Tsai et al., 1998). In *E. coli* ist die Serin-Protease Pic (*protease involved in colonization*) wichtig für die Invasion in Darmepithelzellen (Carroll and Maharshak, 2013). Jedoch erfolgt die Beteiligung bakterieller Proteasen an der Adhärenz und Invasion von Wirtszellen meist nur indirekt durch Prozessierung anderer Faktoren, die in diesen Prozessen eine übergeordnete Rolle spielen. Für ProA wäre ebenfalls eine solch indirekte Rolle bei der Adhärenz an, bzw. Invasion in Wirtszellen denkbar.

In dieser Arbeit zeigte sich außerdem, dass ProA wichtig für die intrazelluläre Replikation ist. Jedoch hing der Einfluss von ProA von dem verwendeten Wirtsorganismus ab. Bei Infektion von *A. castellanii* vermehrte sich die *proA*-defiziente Mutante auch nach 48 h, während für den Wildtyp nach 72 h eine deutlich reduzierte *cfu*/mL detektiert wurde. Allerdings ist dieser Umstand nicht auf eine verzögerte Replikati-

6 Diskussion

on der *proA*-defizienten Mutanten in den Amöben zurückzuführen, da die ermittelte *cfu/mL* 24 h und 48 h nach Inokulierung vergleichbar mit dem Wildtyp waren. Somit scheint die *proA*-Deletionsmutante die Möglichkeit zu haben, sich länger in der LCV zu vermehren als der Wildtyp. Interessanterweise konnte dieser Umstand nur bei Infektion von *A. castellanii* beobachtet werden, nicht jedoch in *V. vermiformis* und THP-1-Makrophagen.

Ein Ansatzpunkt könnte hier die Induktion der Wirtszellyse sein. Diese kann durch verschiedene Mechanismen ausgelöst werden. In Säugetier-Wirtszellen wird der Zelltod in zwei Stufen eingeleitet. Zunächst erfolgt in der frühen Phase der Infektion die Induktion der Caspase-3-vermittelten Apoptose (Müller et al., 1996, Gao and Abu Kwaik, 1999a,b). In der späteren Phase wird die Wirtszell-Nekrose durch den Übergang der Legionellen in die postexponentielle Wachstumsphase vermittelt und hängt mit der Bildung von Poren in der LCV und der Wirtszellmembran zusammen (Byrne and Swanson, 1998, Gao and Abu Kwaik, 1999b). In Amöben ist die Zellyse jedoch nur von einer porenbildenden Eigenschaft von *L. pneumophila* abhängig, wie es bereits in *A. polyphaga* gezeigt wurde (Gao and Kwaik, 2000, Harb et al., 2000). Für ProA konnte bereits beobachtet werden, dass es intrazellulär auch außerhalb der LCV lokalisiert ist (Truchan et al., 2017). Welche Funktion die Protease dort ausübt, ist bisher nicht geklärt. Auch die Mechanismen der Porenbildung in Amöben sind bisher nicht genau bekannt. Es wurde allerdings gezeigt, dass diese nicht von einem intakten T2SS, sondern von der *icmT*-Expression abhängen (Molmeret et al., 2002b,a). Daher ist es eher unwahrscheinlich, dass ProA in diesen Prozess involviert ist. Andererseits ist das Sekretom der *proA*-negativen Mutante massiv verändert. Einflüsse auf Typ IV-sekernierte Effektoren wären daher durchaus möglich. Auch für Proteasen anderer Pathogene konnte bereits eine Beteiligung an der Wirtszellyse beobachtet werden. So spaltet die *Chlamydia*-Protease CPAF (*chlamydial protease-like factor*) verschiedene bakterielle Effektorproteine und Transkriptionsfaktoren des Wirtes und induziert damit die Lyse des Wirtes in der späten Phase der Infektion (Paschen et al., 2008, Jorgensen et al., 2011). Eine ähnliche Funktion für ProA wäre denkbar, da sich das Vorkommen einer aktiven Protease im Zytoplasma leicht mit der Zerstörung der Wirtszelle assoziieren lässt. In den durchgeführten Infektionsversuchen wurde jedoch nicht zwischen intra- und extrazellulär vorliegenden Bakterien unterschieden, sondern immer die Gesamtzellzahl betrachtet. In weiterführenden Studien könnte geschaut werden, ob die *proA*-defiziente Mutante länger in der Wirtszelle verbleibt.

In jüngeren Studien wurde nachgewiesen, dass *L. pneumophila* die Zellteilung und die DNA-Replikation von *A. castellanii* während des Infektionsprozesses unterdrückt (Mengue et al., 2016). Es wäre zu überprüfen, ob dieser Prozess bei Infektion mit der *proA*-defizienten Mutante verlangsamt oder verringert ist, sodass sich die Amöben weiter teilen können. Dadurch würden der *proA*-Deletionsmutante mehr Wirtszellen zur Verfügung stehen und eine Vermehrung über einen längeren Zeitraum erfolgen. Zwar ist dieser Prozess auch T4SS-abhängig, jedoch könnte ProA auch hier eine indirekte, regulatorische Rolle übernehmen.

Der Umstand, dass die im Vergleich zum Wildtyp erhöhte *cfu*/mL von *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ nur in *A. castellanii* zu beobachten war, ist ebenfalls interessant und bestätigt, dass eine Legionellen-Infektion in den verschiedenen Amöben-Spezies von gänzlich anderen Faktoren abhängen kann. So konnte bereits in frühen Studien ein Einfluss von ProA auf die intrazelluläre Replikation in *V. vermiformis* beobachtet werden (Rossier et al., 2008, Tyson et al., 2013). Auch in dieser Arbeit ließen sich diese Resultate bestätigen. Die *proA*-Deletionsmutante zeigte 72 h nach Inokulierung eine signifikant reduzierte *cfu*/mL. Außer für ProA konnte bisher auch für die ebenfalls Typ II-sezernierten Proteine PlaC, welches von ProA aktiviert wird, und der Ribonuklease SrnA ein Einfluss auf die intrazelluläre Vermehrung von *L. pneumophila* in *V. vermiformis* nachgewiesen werden. Doppelmутanten, die für *proA* und *plaC* oder *proA* und *srnA* defizient waren, zeigten sogar noch größere Defekte in der intrazellulären Replikation (Rossier et al., 2009, Tyson et al., 2013). Interessanterweise kamen diese beiden Proteine auch im Sekretom der *proA*-Deletionsmutante deutlich vermindert vor (siehe Zusatztabelle im Anhang). Allerdings bleibt zu erwähnen, dass der Unterschied zum Wildtyp-Sekretom nach dem Student's *t*-Test keine Signifikanz ergab. Nichtsdestotrotz könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass das veränderte Sekretom von *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ auch hier eine Rolle spielt und dass, neben PlaC, auch SrnA in irgendeiner Weise von ProA abhängig ist. Bei Effektoren des T2SS wurde auch schon in früheren Veröffentlichungen vermutet, dass nicht ein Protein allein für die Virulenz in Wirtszellen verantwortlich ist, sondern das Zusammenspiel von vielen (Rossier et al., 2008, Tyson et al., 2013). Ein ähnlicher pleiotropher Einfluss wäre auch für ProA denkbar. Es bleibt allerdings zu erwähnen, dass die Vermehrung zu einem so späten Zeitpunkt der Infektion (72 h) in *V. vermiformis* gering ausfällt. Für die unterschiedlichen *cfu*/mL von Wildtyp und *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ könnten auch eine Wirtszelllimitierung oder andere Sekundäreffekte verantwortlich sein.

6 Diskussion

Für die *pepN*-defiziente Mutante konnte zwar in *A. castellanii* kein Einfluss auf die Infektion nachgewiesen werden, jedoch zeigte sie in *V. vermiformis* nach 72 h eine signifikant verringerte *cfu*/mL im Vergleich zum Wildtyp. Die genaue Lokalisation der Aminopeptidase ist nicht genau bekannt. Mit den Programmen SignalP und PSORT wurde das Vorkommen im Zytosol vorhergesagt. Jedoch ist PepN durchaus im Sekretom zu finden. Im Kulturüberstand der *proA*-defizienten Mutante kommt sie sogar signifikant reduziert vor. Dieser Umstand ist interessant im Hinblick darauf, dass PepN für die im Vergleich zum Wildtyp verminderte *cfu*/mL von *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ in *V. vermiformis* verantwortlich sein könnte. So zeigte auch eine Doppelmutante, die defizient für *proA* und *pepN* ist, eine im Vergleich zum Wildtyp deutlich verringerte *cfu*/mL nach 48 h und 72 h (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse sind somit sehr ähnlich zu denen, die mit Doppel-Deletionsmutanten von *proA* und *plaC* oder *proA* und *srnA* erzielt wurden. Eine Abhängigkeit von PepN von ProA ist also durchaus denkbar und bekräftigt weiterhin die Vermutung, dass ProA in der Wirtszelle eher als indirekter Virulenzfaktor wirkt. Wie genau PepN die Vermehrung in *V. vermiformis* beeinflusst, kann jedoch nur spekuliert werden. Als zytosolische Peptidase könnte sie dort relevante Prozesse durch Modulation anderer Proteinfaktoren beeinflussen. Weiterhin bleibt auch hier zu erwähnen, dass, bedingt durch die eher geringe Vermehrung von *L. pneumophila* nach 72 h, auch andere Faktoren wie Wirtszelllimitierung und weitere Sekundäreffekte für die, im Vergleich zum Wildtyp, verringerte *cfu*/mL zu diesem Zeitpunkt verantwortlich sein können.

In THP-1-Makrophagen konnte dagegen nur für die *proA*-Deletionsmutante eine im Vergleich zum Wildtyp nach 48 h verminderte *cfu*/mL festgestellt werden. Dieses Defizit hängt hier jedoch höchstwahrscheinlich nicht mit PlaC oder SrnA zusammen, da die Deletion von *plaC*, bzw. *srnA* nicht zu einer veränderten Replikation in Makrophagen führte (Cianciotto, 2013). Womöglich ist der Einfluss von ProA in THP-1-Zellen eher immunregulatorischer Natur. Durch die Präsenz von ProA im Wirtszellzytoplasma könnte die Protease in die Immundetektion der Wirtszelle eingreifen (Truchan et al., 2017). Jedoch wurde ein intrazellulärer Einfluss bakterieller Proteasen auf die Immundetektion durch den Wirt bisher nur sporadisch beschrieben (Agrawal and Pulendran, 2004, Russell et al., 2015). Dabei sind extrazelluläre Proteasen vieler Pathogene durchaus in immunregulatorische Prozesse involviert. Die *Pseudomonas*-Protease AprA degradiert z.B. sehr effizient IL-6 oder beeinflusst die Chemotaxis von Neutrophilen (Kharazmi et al., 1984, Matheson et al., 2006). Die zu ProA homologe Elastase

LasB aus *P. aeruginosa* spaltet die *Surfactant*-Proteine SP-A und SP-D, welche für die Erkennung bakterieller Oligosaccharide durch Typ II-Epithelzellen wichtig sind (Mariencheck et al., 2003). Auch für ProA konnten schon verschiedene Einflüsse auf die Immundetektion des Wirtes beobachtet werden (Hell et al., 1993, Mintz et al., 1993, McCoy-Simandle et al., 2011). Ein Beispiel für eine Protease, die intrazellulär die Immunerkennung durch die Wirtszelle verhindert, ist auch hier die *Chlamydia*-Protease CPAF. Diese spaltet 16 verschiedenen Wirtsproteine, darunter auch Transkriptionsfaktoren, die an der Immundetektion beteiligt sind (Zhong, 2011, Chen et al., 2012). Eine mögliche Teilnahme von ProA bei solch intrazellulären Prozessen müsste in weiterführenden Studien näher untersucht werden. Eine andere Möglichkeit wäre, dass andere, für die Infektion von Amöben nicht relevante, ProA-abhängige Faktoren bei der Replikation in THP-1 wichtig sind.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, wie unterschiedlich die Mechanismen sind, die *L. pneumophila* für die intrazelluläre Replikation in den verschiedenen Wirtszellen benötigt. Weiterhin scheint ProA die Vermehrung zwar eher indirekt zu beeinflussen, dabei jedoch trotzdem eine zentrale Rolle zu spielen, da viele Faktoren von dem Vorkommen der Protease abhängen. Außerdem konnte PepN als ein möglicher Virulenzfaktor von *L. pneumophila* identifiziert werden.

Die Aminopeptidase LpC_0267 zeigte in keinem der durchgeführten Infektionsversuche einen Einfluss auf die intrazelluläre Replikation von *L. pneumophila*. Somit scheint es sich hierbei nicht um einen Virulenzfaktor zu handeln.

6.5 ProA ist wichtig für die Infektion von humanem Lungengewebe

Humane Pathogene haben eine Vielzahl an Strategien entwickelt, um Wirtsgewebe effektiv zu kolonisieren und in tiefere Gewebeschichten vorzudringen. Eine besonders wichtige Rolle spielen extrazelluläre Proteasen, die dabei unterschiedliche Aufgaben übernehmen können. Bei einigen Pathogenen aktivieren die Proteasen Oberflächenfaktoren oder extrazelluläre Virulenzfaktoren des Bakteriums, die für die Infektion benötigt werden. Anderen Proteasen wiederum dienen strukturelle Komponenten des Wirtsgewebes als Targets. Dies kann zu einer massiven Zerstörung der Gewebestrukturen führen und den Weg für eine Ausbreitung der Infektion ebnen (Maeda, 1996, Singh et al., 2012, Koziel and Potempa, 2013).

6 Diskussion

Ein wichtiger Bestandteil von Geweben ist die extrazelluläre Matrix (*extracellular matrix*, ECM). Diese bildet das strukturelle Gerüst eines Gewebes und ist in verschiedenste physiologische Prozesse involviert (Hynes, 2009). Die ECM bildet z.B. Basalmembranen aus, umkleidet Blutkapillaren und Neuronen und ist Teil des Bindegewebes, welches die Zwischenräume von Parenchym-Geweben ausfüllt. Hauptbestandteil von Basalmembranen sind Laminine und Kollagene, welche auch im Bindegewebe zu finden sind. Dieses besteht weiterhin aus Elastin, Fibrillin, Fibronectin, Vitronectin, Thrombospondin, Proteoglykanen und Hyaluronsäure (Singh et al., 2012). ECM-degradierende Proteasen werden von vielen Pathogenen gebildet. So produzieren einige *Vibrio*- und *Bacillus*-Spezies Proteasen, die Kollagen I abbauen (Lund and Granum, 1999, Kim et al., 2002). *Clostridium* spp. sezerniert spezielle Kollagenasen, welche die Kollagen-Typen I, II, III, IV und V degradieren können (Shi et al., 2010, Pruteanu et al., 2011). LasB aus *P. aeruginosa* spaltet unter anderem Elastin, Kollagen III und IV sowie Proteoglykane und Laminin. Dabei agiert LasB gemeinsam mit der Endopeptidase LasA, da diese die elastolytische Aktivität von LasB erhöht und beide Proteasen kritisch für die Infektion von Wirtsgeweben sind (Hoge et al., 2010).

Auch für ProA aus *L. pneumophila* konnten bereits ähnliche Aktivitäten, wie die Spaltung von Gelatine und Kollagen, nachgewiesen werden (Conlan et al., 1986). Im Zuge der Studien von Conlan et al. wurde auch pathologisch eine Gewebe-degradierende Aktivität der Protease nachgewiesen. Bei Inokulierung von Meerschweinchen mit gereinigtem ProA zeigten sich hämorrhagische Läsionen zum einen subpleural, jedoch auch zentral in der Lunge. Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Gewebes wiesen bereits eine halbe Stunde nach Inokulierung eine Nekrose des alveolaren Epi- und Endothels auf. Nach 24 h wurden massive Ödem- und Fibrin-Ansammlungen in den Alveoli sowie eine hohe Infiltration von PMNs und Makrophagen gefunden. In vielen Bereichen waren die alveolaren Septen zerstört und inflammatorische Exudate hatten sich in den bronchialen Lumen angesammelt. Weiterhin wurde eine vermehrte Beschädigung des alveolaren Epi- und Endothels, die Auflösung der Basalmembran sowie eine starke Reduktion der Kollagenfasern in den interalveolaren Septen nachgewiesen (Baskerville et al., 1986). Ein Jahr später konnten Williams et al. (1987) mittels elektronenmikroskopischen Aufnahmen und Immunmarkierung eine unmittelbare Assoziation der pulmonaren Läsionen mit ProA detektieren. Infektionen von Meerschweinchen mit einer *proA*-negativen Mutante führten zu einer deutlich verlängerten Lebenszeit der Tiere im Vergleich zur Infektion mit dem Wildtyp. Weiterhin wurde

in den Lungen der Meerschweinchen, die mit der *proA*-negativen Mutante infiziert wurden, eine deutlich reduzierte Vermehrung des Bakteriums nachgewiesen. Das Gewebe war außerdem weniger nekrotisch, wies jedoch auch eine erhöhte Infiltration von Makrophagen auf. Interessanterweise konnte für den Wildtyp auch eine bessere Ausbreitung im Gewebe detektiert werden (Moffat et al., 1994b).

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von ProA bei der Infektion von explantiertem humanem Lungengewebe (HLTE) untersucht. Das HLTE-Modell bietet dabei die Vorteile eines komplexen Gewebes mit einer Vielzahl an Zelltypen und extrazellulären Komponenten. Weiterhin können die Wirtszellen sowohl untereinander als auch mit *L. pneumophila* interagieren. Im Gegensatz zum Tiermodell ist eine Infektion deutlich vergleichbarer mit einer Legionellose beim Menschen (Jäger et al., 2014).

Im HLTE-Modell konnte für die *proA*-defiziente Mutante eine deutlich verringerte Gewebeschädigung im Vergleich zur Infektion mit dem Wildtyp nachgewiesen werden. Zwar wurde auch hier 24 h, bzw. 48 h nach Infektionsbeginn eine leichte Verschlechterung der alveolaren Integrität, geringe Epithelablösungen und kleinere Exudatansammlungen beobachtet, jedoch waren diese eher vergleichbar mit der mitgeführten Medium-Kontrolle. Bei Inokulierung des Gewebes mit gereinigtem ProA zeigte sich dagegen eine massive Schädigung des Gewebes. Eine erhöhte Menge an Proteinexudaten konnte bereits 2 h nach Inokulierung beobachtet werden. Nach 24 h und 48 h verschlechterte sich die alveolare Integrität massiv und deutlich vermehrte Epithelablösungen wurden detektiert. Die Resultate waren dabei vergleichbar mit der Infektion des Gewebes mit *L. pneumophila* Corby WT. Dies zeigte, dass ProA einen großen Anteil an Zerstörung des Lungengewebes bei der HLTE-Infektion hat. Somit ließen sich die bisherigen Beobachtungen im Tiermodell bestätigen, die nähere Rückschlüsse auf die Rolle von ProA während einer Legionellose beim Menschen zulassen.

Der respiratorische Trakt besteht beim Menschen hauptsächlich aus Laminen und Kollagenen. Im Zwischengewebe sind dabei hauptsächlich die Kollagen-Typen I und III vertreten, im Knorpel meist Kollagen II und in der Basalmembran die Kollagen-Typen IV und VI (Gil and Martinez-Hernandez, 1984, Amenta et al., 1988, Davidson, 1990). Wie schon erwähnt, konnte eine Kollagen-degradierende Eigenschaft für ProA bereits bestätigt werden (Conlan et al., 1986, Baskerville et al., 1986). Jedoch wurde bisher nicht gezeigt, welche Kollagen-Typen genau von der Protease abgebaut werden. Vermutlich kann, bedingt durch die geringe Spezifität der Protease, eine abbauende Eigenschaft mehrerer Kollagen-Typen angenommen werden. Interessanterweise

6 Diskussion

konnte bei früheren HLTE-Infektionen für die *mip*-Deletionsmutante, ähnlich wie bei der *proA*-defizienten Mutante, eine im Vergleich zur Infektion mit dem Wildtyp geringere Gewebeerstörung nachgewiesen werden (Rasch, 2016). Eine Zugabe von gereinigtem Mip wirkte sich dabei jedoch nicht auf die Degradierung des Gewebes aus, was zeigt, dass Mip selbst nicht dafür verantwortlich ist. Weiterhin wurde gezeigt, dass Mip an der Transmigration durch eine NCI-H292/ECM-Barriere beteiligt ist (Wagner et al., 2007). Da Mip an Kollagen IV binden kann, wäre es möglich, dass es mit ProA zusammen agiert. Mip ist auf der Oberfläche der Bakterien lokalisiert und könnte somit eine räumliche Nähe der Legionellen zu dem zu infizierenden Gewebe herstellen. Das sezernierte ProA würde dadurch direkt zu den Target-Strukturen gelangen und eine effizientere Gewebe-Degradation wäre möglich. Bei der Etablierung des HLTE-Modells konnten bereits eine lokale Assoziation von adhärenenten Legionellen und der Zerstörung des Gewebes sowie Epithelablösung beobachtet werden (Jäger et al., 2014). Bei Sekretom-Untersuchungen der *mip*-defizienten Mutante wurde jedoch kein Unterschied der im Sekretom vorkommenden ProA-Konzentration im Vergleich zum Wildtyp festgestellt (Rasch, 2016). Somit ist das Vorkommen von ProA im Sekretom nicht abhängig von Mip.

Ob ProA auch Laminin degradieren kann, wurde bisher nicht untersucht. Durch seine geringe Substratspezifität und die Homologie zu anderen, ECM-spaltenden Proteasen, kann jedoch angenommen werden, dass ProA eine Vielzahl weiterer Gewebestrukturen degradieren kann. In weiterführenden Studien sollten diese genauer analysiert werden (Abb. 6.2). Dabei würde auch die Lokalisation von ProA während der Lungeninfektion eine Rolle spielen und könnte weitere Rückschlüsse auf Zielstrukturen und eine mögliche Synergie mit anderen Virulenzfaktoren von *L. pneumophila*, wie z.B. Mip, zulassen. Weiterhin wäre es interessant zu untersuchen, ob außer ProA weitere Proteasen an der Gewebeerstörung beteiligt sind.

In dieser Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass ProA die intrazelluläre Replikation von *L. pneumophila* in HLTEs beeinflusst. Dabei vermehrt sich die *proA*-defiziente Mutante schlechter als der Wildtyp. Eine signifikante Differenz konnte 48 h nach Infektionsbeginn beobachtet werden. Dies kann zum einen natürlich auf das Vermehrungsdefizit der *proA*-Deletionsmutante zurückzuführen sein, das auch bei der Infektion von THP-1-Makrophagen beobachtet wurde. Auch hier lag eine signifikante Differenz zum Wildtyp 48 h nach Infektionsbeginn vor. Jedoch besteht das humane Lungengewebe aus einer Vielzahl an Zelltypen und *L. pneumophila* kann sich z.B.

auch in Lungenepithelzellen effektiv vermehren. Für ProA konnte bisher kein Einfluss auf die Replikation in humanen Lungenepithelzellen nachgewiesen werden (McCoy-Simandle et al., 2011). Daher ist es fraglich, ob das alleinige und auch eher geringe Vermehrungsdefizit der *proA*-negativen Mutante in den Makrophagen zu einem sichtbaren Phänotyp in der HLTE-Infektion führen kann.

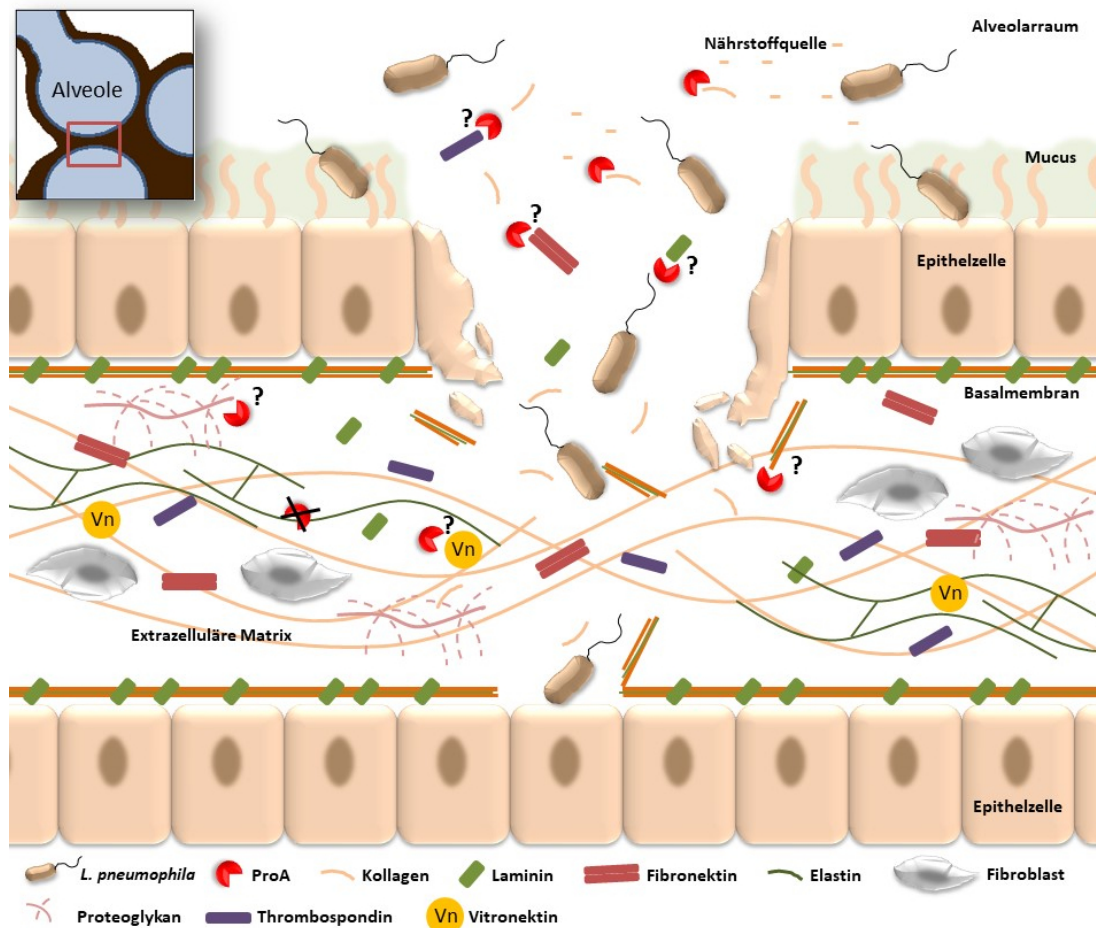


Abbildung 6.2: Mögliche Ziele von ProA während der Gewebedegradation in HLTEs. Der interstitielle Raum enthält verschiedene Strukturen wie die Basalmembran mit eingelagertem Laminin und die extrazelluläre Matrix (ECM). Die extrazelluläre Matrix bildet das Gerüst eines Gewebes und setzt sich aus einer Vielzahl an Komponenten, wie Kollagen, Elastin, Fibronectin, Proteoglykanen, Thrombospondin oder Vitronectin, zusammen. Bisher konnte für ProA nur eine Kollagen-degradierende Aktivität nachgewiesen werden. Elastin wird nicht durch ProA gespalten. Da für ProA in dieser Arbeit eine wichtige Rolle bei der Gewebeerstörung festgestellt werden konnte, können jedoch weitere Komponenten der ECM als potentielle Ziele angenommen werden.

Andererseits sind alveolare Makrophagen vermutlich die wichtigsten Zellen für die intrazelluläre Replikation von *L. pneumophila* in Lungengewebe. Wie bereits erwähnt, dient die Zerstörung von Geweben durch Proteasen auch der besseren Ausbreitung

6 Diskussion

der Pathogene während der Infektion. Da ProA nachweislich die Gewebestrukturen in der humanen Lunge degradieren kann, könnte die verringerte Replikation der *proA*-negativen Mutante in den HLTEs auf eine schlechtere Ausbreitung der Bakterien zurückzuführen sein. Dies würde auch die Beobachtungen von Moffat et al. (1994b) bestätigen, nach denen sich eine *proA*-negative Mutante von *L. pneumophila* schlechter im Lungengewebe von Meerschweichen ausbreiten konnte, als der Wildtyp. Eine gute Ausbreitung der Bakterien im Gewebe führt auch gleichzeitig zu einer erhöhten Replikation, da so besser neue Wirtszellen erreicht werden können. Weiterhin wird den Legionellen durch die Degradation der ECM durch ProA womöglich der Zugang zu weiteren Wirtszellen, wie Lungenepithelzellen, erleichtert und die Adhäsion an deren Oberfläche ermöglicht. Nicht außer Acht gelassen werden sollte auch der Umstand, dass ProA durch die Gewebedegradation *L. pneumophila* den Zugang zu Nährstoffen wie Aminosäuren ermöglichen könnte. Interessant wäre es, in weiteren Studien die genaue Lokalisation von ProA im Lungengewebe während der *L. pneumophila*-Infektion zu untersuchen. Da ProA auch in den Außenmembranvesikeln von *L. pneumophila* vorkommt, wäre es weiterhin sinnvoll zu analysieren, ob die Gewebeerstörung von freiem sowie von OMV-assoziiertem ProA gleichermaßen abhängig ist. Es konnte bei Inkubation von HLTEs mit OMVs ebenfalls eine mit dem Wildtyp gleichzusetzende Gewebedegradation beobachtet werden (Jäger et al., 2014). Des Weiteren wäre es wichtig, einen *proA*-Komplementationsstamm zu erzeugen, um die hier erhaltenen Ergebnisse zu festigen.

Bei der Degradation von Wirtsgeweben während der Infektion spielen jedoch nicht nur die Proteasen des Pathogens eine Rolle, sondern auch wirtseigene Faktoren. So konnten Jäger et al. (2014) für eine *dotA*-defiziente Mutante eine im Vergleich zum Wildtyp reduzierte Gewebedegradation, auch bei 100-fach erhöhter *cfu*/mL, feststellen. Da das Dot/Icm-System jedoch nicht mit der ProA-Sekretion in Verbindung steht, wird vermutet, dass es stattdessen Effektoren ausschleust, die möglicherweise die Aktivierung von Wirtszellprotease oder z.B. Pyroptose auslösen. Vielleicht aktiviert ProA auch zusätzlich Wirtsfaktoren, die eine Gewebedegradation unterstützen. Ähnliche Funktionen wurden bereits für Proteasen von *V. cholerae*, *P. aeruginosa* und *P. gingivalis* identifiziert, die proteolytisch die Wirtsproteasen MMP-1 (Fibroblasten-Pro-Kollagenase), MMP-8 (Neutrophilen-Kollagenase) und MMP-9 (Neutrophilen-Gelatinase/Typ IV-Kollagenase) aktivieren (Maeda, 1996). Dies würde auch erklären, warum das Gewebe bei Infektion mit der *proA*-Deletionsmutante auch nach 48 h noch völlig intakt

war. Das veränderte Sekretom von *L. pneumophila* Corby $\Delta proA$ könnte dabei ebenfalls eine Rolle spielen und dabei z.B. eine andere Wirtszellreaktion hervorrufen. Hier könnten Proteine weniger oder nicht mehr im Sekretom auftreten, die an der Gewebezersetzung beteiligt sind. Ein möglicher Kandidat wäre z.B. die Protease LasB, welche Homologien zu der gleichnamigen Elastase aus *P. aeruginosa* aufweist und im Sekretom der *proA*-Deletionsmutante nicht vorkommt.

Die Untersuchungen der HLTE-Infektionen zeigen, dass die Zerstörung des Gewebes einen essentiellen Teil der Infektion der Lunge durch *L. pneumophila* darstellt. Da ProA die Hauptdeterminante in diesem Prozess ist, kann es als einer der wichtigsten Virulenzfaktoren bei einer Legionellose des Menschen betrachtet werden. Somit ist ProA ein vielversprechendes Ziel zukünftiger Therapeutika gegen die Legionärskrankheit. Der Einsatz von spezifischen Protease-Inhibitoren als Therapeutika wurde bereits anhand anderer Beispiele untersucht (Hiemstra, 2002, Doyle et al., 2007, Craik et al., 2011). Diese könnten als Vorlage zur Entwicklung einer spezifischen Inhibitors dienen, um die ECM-Degradation durch ProA in der Lunge zu limitieren und die Invasion von *L. pneumophila* zu kontrollieren.

6.6 ProA verhindert die Flagellin-vermittelte Immundetektion

Pathogene Bakterien müssen mit ihrem Wirt interagieren, um eine Infektion erfolgreich zu etablieren und aufrecht zu erhalten. Dafür ist es vonnöten, die Signale des Immunsystems wahrzunehmen und darauf zu reagieren, wenn der Wirt versucht, sich gegen die Infektion zur Wehr zu setzen. Um einer Detektion durch das Immunsystem zu entgehen, haben Pathogene eine Vielzahl an Mechanismen entwickelt. Als Parasit von Frischwasser-Amöben kann *L. pneumophila* z.B. die Verschmelzung des Phagosoms mit dem Lysosom verhindern, wobei vermutlich hauptsächlich Effektoren des Dot/Icm-Systems eine Rolle spielen. Bei diesem Prozess werden unter anderem die phagosomalen Membranen aktiv so verändert, dass sie durch den Wirt nicht mehr als Pathogen-haltig identifiziert werden können. Dot/Icm-Effektor-Proteine greifen z.B. in die Signalwege von Wirts-GTPasen ein, die den Vesikel- und Membrantransport regulieren (Hubber and Roy, 2010). Eine weitere Strategie von *L. pneumophila*, um sich effizient in Wirtszellen vermehren zu können, ist die Verhinderung des frühzeitigen Zelltodes, welcher zum Abbruch der Infektion führen würde. Dabei aktivieren die bei-

6 Diskussion

den Dot/Icm-Effektoren LegK1 und LnaB in Säugetierzellen den Masterregulator NF- κ B, welcher die Expression von anti-apoptotischen Genen reguliert (Abu-Zant et al., 2007). Ähnliches gilt auch für die Aktivierung des MAP-Kinaseweges. Dieser existiert sowohl in Säugetierzellen als auch in Amöben und reguliert ebenfalls die Expression anti-apoptotischer Gene (Li et al., 2009). Weiterhin können Legionellen die transkriptionelle Induktion von Typ I-IFN-Genen bei der Infektion von Maus-Makrophagen verhindern (Monroe et al., 2009). Ein Protein, das im Zusammenhang mit der Verhinderung der Immundetektion von *L. pneumophila* durch den Wirt identifiziert wurde, ist das periplasmatische EnhC. Dieses gehört zu einer Reihe sogenannter *enhanced entry*-Proteinen und verbessert die Aufnahme der Legionellen in nicht-phagozytische Zellen (Cirillo et al., 2000, Chien et al., 2004). Liu et al. (2008) fanden heraus, dass EnhC die Aktivität der Peptidoglykan-degradierenden Transglycosylase SltL reduziert und so die NOD1-abhängige Detektion der Bakterien verringert. EnhC scheint jedoch nur eine von wenigen Ausnahmen zu sein, da *L. pneumophila*, eher an das Überleben in der Umwelt angepasst, nur eine geringe Anzahl an Mechanismen verfügt, die die Immundetektion in Säugetierzellen aktiv verhindern.

In dieser Arbeit konnte ProA als eine weitere dieser Ausnahmen identifiziert werden. Durch die Degradierung von monomerem FlaA ist ProA in der Lage, die Flagellin-vermittelte TLR5-Aktivierung zu verhindern. Nur monomeres FlaA löst den TLR5-vermittelten Signalweg aus, da die vermutlich dafür relevanten N- und C-Termini des Proteins im Flagellum auf der Innenseite lokalisiert sind. Polymeres FlaA wurde dagegen nicht von ProA abgebaut, was zeigt, dass die Motilität von *L. pneumophila* nicht beeinflusst wird. Für die Aktivierung von TLR5 ist nur eine geringe Konzentration von Flagellin im pikomolaren Bereich vonnöten. Daher konnte sowohl bei der Inkubation der HEK-Blue™-Zellen als auch der HLTEs mit *L. pneumophila* Corby WT eine Aktivierung von TLR5 beobachtet werden. ProA ist somit in seiner "natürlichen" Konzentration vermutlich nicht in der Lage, das komplette, frei vorkommende Flagellin abzubauen. Dies deckt sich mit aktuellen Untersuchungen von *P. aeruginosa* (Bardoel et al., 2011, Casilag et al., 2015). Obwohl der Abbau von Flagellin durch die Beteiligung von zwei Proteasen (AprA und LasB) sehr effizient erfolgt, konnte eine Flagellin-abhängige IL-8-Produktion bei Inkubation von A549-Gluc-Zellen mit dem Wildtyp PA14 gemessen werden. Für Kulturüberstände des Wildtyps von *P. aeruginosa* wurde allerdings keine TLR5-Aktivierung gemessen.

Nichtsdestotrotz wurde für die *proA*-defiziente Mutante eine im Vergleich zum Wild-

typ signifikant erhöhte TLR5-Aktivierung beobachtet. Dies zeigt, dass ProA eine wichtige Rolle bei der Reduktion der Immunantwort des Wirtes spielt. Diese Ergebnisse konnten auch für Infektionen von humanem Lungengewebe bestätigt werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass ProA auch die CXCL8-Produktion in HLTEs reduziert, was die medizinische Relevanz dieser Ergebnisse betont. Somit ist ProA nicht nur in der Lage, die TLR5-Aktivierung in einem komplexen Gewebe zu minimieren, sondern beeinflusst dadurch auch die proinflammatorische Antwort. TLR5 ist im Lungengewebe hauptsächlich auf Lungenepithelzellen präsent, wird jedoch auch von Immunzellen wie alveolaren Makrophagen, PMNs und NK-Zellen exprimiert. Schon in früheren Studien konnte gezeigt werden, dass bei *L. pneumophila*-Infektionen die Flagellin-vermittelte TLR5-Aktivierung auf Lungenepithelzellen vor allem die Expression von CXCL8, bzw. IL-8 auslöst. Auch generell ist IL-8 der wichtigste proinflammatorische Botenstoff, dessen Produktion durch *L. pneumophila*-Flagellin induziert wird (Hawn et al., 2003, Honko and Mizel, 2005). Humanes CXCL8 kann von leukozytischen Zellen (Monozyten, T-Zellen, Neutrophilen, NK-Zellen) und nicht-leukozytischen Zellen (Endothelzellen, Fibroblasten, Epithelzellen) gebildet werden. Es führt unter anderem zur Migration von Neutrophilen durch Endothel- und Epithelbarrieren und kann verschiedene Funktionen der Neutrophilen, wie Degranulation und oxidativen Burst, induzieren (Oppenheim et al., 1991, Mukaida et al., 1992, Baggiolini et al., 1997, Mukaida, 2000, Mul et al., 2000). Weiterhin wird vermutet, dass CXCL8 auch an der Migration von Makrophagen beteiligt ist (Gerszten et al., 1999).

Doch welche Zellen sind speziell bei der Infektion von humanem Lungengewebe durch *L. pneumophila* an diesen Mechanismen beteiligt? Vermutlich reagieren hier in erster Linie die Lungenepithelzellen auf das monomere FlaA, da diese Zellen früh mit dem Erreger in Kontakt kommen. Weiterhin sind Lungenepithelzellen polar und TLR5 liegt auf der apikalen, dem alveolaren Raum zugewandten Seite exponiert vor, was eine effiziente Detektion des Flagellins ermöglicht (Adamo et al., 2004). Die dadurch ausgelöste Produktion von CXCL8 führt dann wiederum zur Migration von Neutrophilen über die Lungenepithelbarriere in den alveolaren Raum. Obwohl Legionellen in der Lage sind, sich in den Immunzellen zu vermehren, konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass Neutrophile kritisch für eine *L. pneumophila*-Infektion sind. Mäuse, die eine stark verminderte Produktion von Neutrophilen aufwiesen, zeigten eine deutlich erhöhte Anfälligkeit gegenüber einer Legionellen-Infektion als gesunde Mäuse. Vermutet wird, dass die IL-18-vermittelte Rekrutierung von NK-Zellen durch

6 Diskussion

die Neutrophilen dabei wichtig für die Kontrolle der Infektion ist (Tateda et al., 2001, Sporri et al., 2008). Somit könnte die Rekrutierung von Neutrophilen als Reaktion auf eine *L. pneumophila*-Infektion auch in der humanen Lunge eine wichtige Rolle spielen.

FlaA kann weiterhin von TLR5 auf alveolaren Makrophagen erkannt werden. In Versuchen mit murinen Alveolarmakrophagen, die im Gegensatz zu den in vielen Flagellin-Studien verwendeten murinen *Bone marrow-derived macrophages* (BMDMs) TLR5 exprimieren, führte die TLR5-vermittelte FlaA-Detektion zu einer erhöhten Cytokin- und Chemokin-Expression. Interessanterweise scheint Flagellin hier sogar der Hauptauslöser der Cytokin- und Chemokin-Expression zu sein. Detektiert wurden erhöhte TNF- α - und IL-6-Level, die zu einer vermehrten PMN-Rekrutierung in infizierte Mäuselungen führten. Weiterhin konnte durch die Stimulation mit FlaA eine höhere TNF- α -Expression erzielt werden als mit FlhC aus *Salmonella typhimurium*, welches als sehr immunogen gilt. Ein TLR5-abhängiger Einfluss auf die Vermehrung von *L. pneumophila* in den Mäuselungen konnte jedoch nicht festgestellt werden. Die Autoren konnten diesen Detektionsweg von FlaA weiterhin klar von der Naip5- und Nlrc4-vermittelten, zytosolischen Flagellin-Erkennung abgrenzen (Hawn et al., 2007). Da auch humane, alveolare Makrophagen TLR5 exprimieren, könnten die Mechanismen in den HLTEs ähnlich sein. Damit wäre ein Modell denkbar, in dem sowohl TLR5 auf Lungenepithelzellen als auch TLR5 auf alveolaren Makrophagen an der FlaA-abhängigen PMN-Rekrutierung beteiligt sind (Abb. 6.3). Die Bekämpfung der Legionelleninfektion erfolgt dabei nicht durch die Neutrophilen direkt, sondern durch die weitere Rekrutierung anderer Immunzellen, wie NK-Zellen. In weiterführenden Studien wäre es sinnvoll, dies histologisch zu untersuchen.

ProA könnte durch Verhinderung der TLR5-vermittelten Flagellin-Detektion also nicht nur die CXCL8-Produktion in Lungenepithelzellen, sondern auch die TNF- α - und IL-6-Expression in alveolaren Makrophagen beeinflussen, was möglicherweise zu einer starken Einschränkung der Rekrutierung von Immunzellen führen könnte. Dies würde die Infektion des Lungengewebes und eventuell auch die Vermehrung von *L. pneumophila* begünstigen (Abb. 6.4).

Diese Form der proinflammatorischen Antwort ist vermutlich nur in der frühen Phase der *L. pneumophila*-Infektion relevant, was durch die Versuche von Hawn et al. (2007) bereits gezeigt und auch in den Ergebnissen dieser Arbeit bestätigt werden konnte. So wurde ein Einfluss von FlaA auf die CXCL8-Produktion in HLTEs zu späteren Zeit-

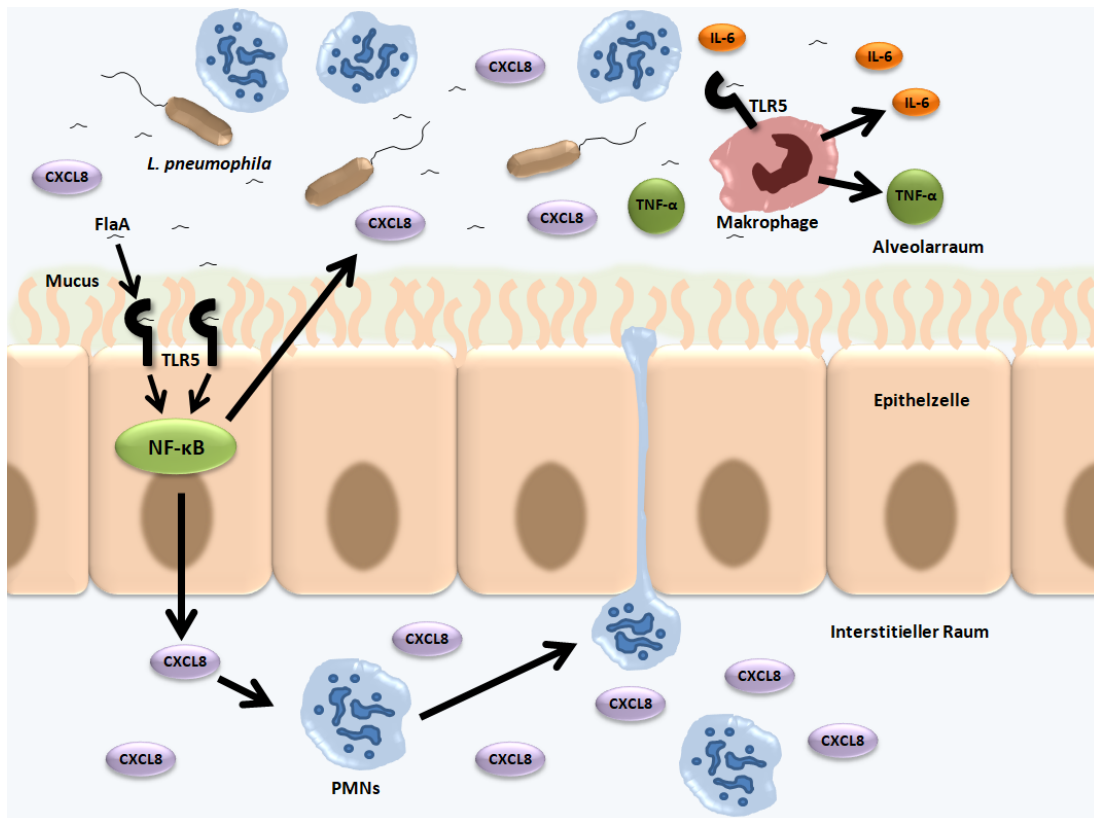


Abbildung 6.3: FlaA-vermittelte TLR5-Aktivierung und Immunantwort bei Infektion der humanen Lunge durch *L. pneumophila*. Während der Infektion von humanem Lungengewebe durch *L. pneumophila* wird monomeres FlaA durch TLR5 erkannt, welches auf der Oberfläche von Lungenepithelzellen und alveolaren Makrophagen präsent ist. Die Stimulation von TLR5 initiiert in Lungenepithelzellen eine komplexe Signalkaskade, die die Aktivierung von NF- κ B und der Produktion von CXCL8 auslöst. CXCL8 spielt eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von Immunzellen wie PMNs. Bei der Aktivierung von TLR5 auf alveolaren Makrophagen wird die Produktion der Cytokine IL-6 und TNF- α initiiert.

punkten (24 h und 48 h nach Inokulation) nicht mehr detektiert (Daten nicht gezeigt). Vermutlich gewinnen dann andere Entzündungsprozesse die Oberhand.

Zytosolisches FlaA wird über das Naip5/Nlrc4-Inflammasom detektiert. Auch hier wäre ein Einfluss von ProA denkbar. Aktuelle Studien von Truchan et al. (2017) zeigen, dass ProA aus der LCV transloziert wird und in das Wirtszell-Zytoplasma gelangt. Interessanterweise konnte dies jedoch nicht für Mausmakrophagen gezeigt werden. Diese Zelllinien weisen bei Infektion mit *L. pneumophila* eine sehr effiziente Detektion von zytosolischem FlaA durch Naip5 und Ipaf (Nlrc4) auf (Molofsky et al., 2006, Pereira et al., 2011). Vielleicht ist ProA in der Lage, Flagellin auch intrazellulär zu spalten und damit die zytosolische Immundetektion von *L. pneumophila* einzudäm-

6 Diskussion

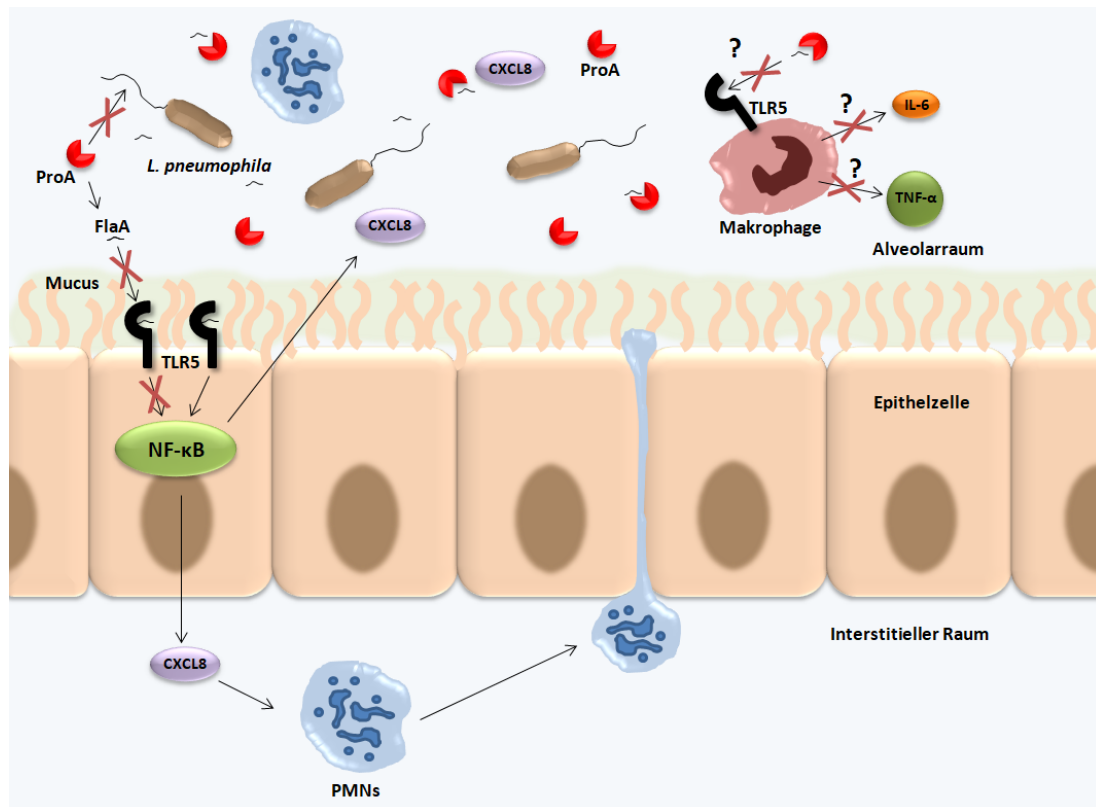


Abbildung 6.4: Modell zur Vermeidung der TLR5-vermittelten Immunantwort durch ProA. Das durch *L. pneumophila* sezernierte ProA ist in der Lage, monomeres FlaA zu degradieren. Die intakte Flagelle wird dabei jedoch nicht beeinflusst. Dadurch kommt es zu einer deutlich Reduktion der TLR5-Aktivierung und der CXCL8-Produktion, was vermutlich zu einer verminderten Rekrutierung von Immunzellen, wie PMNs, führt. Weiterhin könnte ProA die Aktivierung von TLR5 auf alveolaren Makrophagen unterbinden und somit einen Einfluss auf die Produktion der Cytokine IL-6 und TNF- α nehmen. Dadurch würde eine stabilere und effizientere Infektion des Lungengewebes durch *L. pneumophila* ermöglicht werden.

men.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Infektionsstudien mit Amöben und alveolaren Makrophagen zeigten, dass die *proA*-defiziente Mutante Schwierigkeiten bei der Etablierung der Infektion hat. Möglicherweise könnte auch dieser Umstand mit dem Abbau freien Flagellins durch ProA zusammenhängen. Ist ProA nicht vorhanden, wird FlaA nicht degradiert und die Wirtszellen können schnell Abwehrmechanismen mobilisieren, die eine erfolgreiche Infektion durch *L. pneumophila* erschweren. Wenn dies zutrifft, müssten auch Amöben über einen Mechanismus verfügen, der bakterielles Flagellin erkennt. Dies wurde jedoch bisher nicht untersucht. Allerdings konnte bei Infektion von *A. castellanii* mit *L. pneumophila* kein Einfluss von FlaA auf die intrazelluläre

re Vermehrung festgestellt werden (Pereira et al., 2011). In der Infektion von HLTEs konnte kein Einfluss von ProA auf die Etablierung der Infektion beobachtet werden. Jedoch sind Gewebeinfektionen ungleich komplexer als Monolayer-Infektionen und von weitaus mehr Faktoren abhängig. Da die Vermehrungsrate von *L. pneumophila* in HLTEs auch deutlich geringer ausfällt, ist es vermutlich schwierig, solche Etablierungsschwierigkeiten anhand der *cfu* abzulesen. Dies müsste mit sensitiveren Methoden, wie z.B. durch Einsatz von Fluoreszenzmikroskopie, analysiert werden.

Auch wenn die TLR5-vermittelte Immundetektion von *L. pneumophila* in anderen Infektionsmodellen eher eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint, so könnte sie für die Etablierung der Infektion in der humanen Lunge durchaus eine wichtige Rolle spielen. So zeigten Menschen mit einem Stop-Codon-Polymorphismus in der Liganden-Bindedomäne von TLR5 eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber einer Infektion mit Legionellen (Hawn et al., 2003). Eine Eindämmung der TLR5-Aktivierung durch ProA könnte also durchaus Vermehrungsvorteile für *L. pneumophila* in der humanen Lunge bieten. Ob diese Ergebnisse einer erstaunlichen Anpassung eines Umweltbakteriums an den menschlichen Wirt zugrunde liegen oder die Flagellin-Detektion auch in "natürlichen" Wirten von *L. pneumophila* wie Amöben eine Rolle spielt, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

6.7 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ProA rekombinant produziert, gereinigt und erste Kristalle der Protease erzeugt werden. Ein großes Problem bei der Isolierung von ProA war vor allem die starke Eigenproteolyse des Enzyms. Das Unterbinden der Proteaseaktivität würde große Vorteile bei der Reinigung und späteren Kristallisation bieten. Bei der Verwendung von Proteasehemmern oder Komplexbildnern wie EDTA kommt es jedoch immer zu einer Strukturänderung, was die Kristallbildung und Rückschlüsse auf die tatsächliche Struktur des Proteins erschweren kann. Da eine effiziente Produktion von inaktivem ProA nicht möglich ist, müssen hier andere Möglichkeiten gefunden werden. Ein Ansatz wäre die Entwicklung eines spezifischen Inhibitors für ProA. In der Studie von Poras et al. (2012) konnte bereits ein ProA-spezifisches Peptidsubstrat identifiziert werden. Durch Modifikation könnte dieses Peptid so verändert werden, dass es nicht mehr durch ProA gespalten, aber dennoch effizient gebunden wird. Ein solch spezifischer Inhibitor würde nicht nur Vorteile bei der Kristallisation von ProA

6 Diskussion

bieten, sondern könnte auch bei verschiedensten Untersuchungen der Protease zum Einsatz kommen. Bei Infektionsversuchen könnte die Aktivität von ProA so kontrolliert unterbunden werden.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Produktion von ProA im Vergleich zu YEB in CDM stark reduziert ist. Die Bildung von ProA scheint dabei nicht abhängig von dem Vorkommen extrazellulären Proteins oder Calcium zu sein. Womöglich ist die Produktion von ProA stark Zink-abhängig, was in weiteren Studien näher untersucht werden sollte.

Die Sekretionsprofile des Wildtyps und der *proA*-defizienten Mutante zeigten deutliche Unterschiede. Dabei waren viele Proteine, die im Sekretom des Wildtyps vorkommen, bei der *proA*-negativen Mutante verringert oder gar nicht mehr nachweisbar. In weiteren Untersuchungen zeigte sich, dass diese Veränderung des Sekretoms möglicherweise eine negative Auswirkung auf das Überleben von *L. pneumophila* in der Umwelt hat. In weiteren Versuchen sollten auch das Proteom und das Transkriptom der *proA*-defizienten Mutante näher untersucht werden, da ProA eine wichtige Rolle bei der Prozessierung anderer Schlüsselfaktoren spielen könnte. Dabei wäre auch die Untersuchung des Proteoms und Sekretoms von *L. pneumophila* in CDM sinnvoll. Das Minimalmedium wird in vielen Experimenten eingesetzt, jedoch wurde bisher nicht analysiert, welche Proteine dabei tatsächlich von *L. pneumophila* gebildet werden. Der Vergleich der Sekretionsprofile des Wildtyps, bei Wachstum in YEB und CDM, offenbarten in dieser Arbeit sehr deutliche Differenzen, zumal ProA in CDM kaum produziert wurde. Falls das Fehlen von zusätzlichem Zink im CDM tatsächlich der Grund für die sehr geringe Produktion von ProA sein sollte, könnte über eine Optimierung der Rezeptur nachgedacht werden.

Im Rahmen der Sekretomanalysen wurde festgestellt, dass einige, in den Fettsäure-Metabolismus involvierte Enzyme nicht mehr im Kulturüberstand der *proA*-defizienten Mutante vorkommen. Zusätzlich zeigte sich ein Einfluss von ProA und PepN auf die *Sliding Motility* von *L. pneumophila*, die nach aktuellen Studien von Johnston et al. (2016) und Tobias et al. (2016) im Zusammenhang mit dem Polyketid Legionellol A steht. In weiteren Untersuchungen sollte analysiert werden, ob ProA und PepN im Zusammenhang mit der Polyketid-Synthese stehen. Da ProA an vielen, für das Überleben von *L. pneumophila* in der Umwelt relevanten Vorgängen beteiligt zu sein scheint, sollte in zukünftigen Ansätzen auch eine genaue Rolle von ProA innerhalb dieser Mechanismen definiert werden. Speziell bei der Bildung, Etablierung oder dem Verlassen

von Biofilmen könnte ProA maßgeblich beteiligt sein.

Des Weiteren sollte geklärt werden, inwiefern ProA wichtig für Etablierung der Infektion von alveolaren Makrophagen und Amöben ist. ProA könnte natürlich dafür relevante Faktoren direkt oder indirekt prozessieren. Um eine Rolle von ProA bei der Invasion zu definieren, könnten z.B. Invasionsassays durchgeführt werden. Dabei werden die adhären und invasiven Legionellen mittels Immunfluoreszenzfärbung mikroskopisch quantifiziert. Eine andere Hypothese wäre, dass die fehlende Spaltung von freiem FlaA bei der *proA*-defizienten Mutante eine frühe Immunreaktion der Wirtszelle begünstigt und somit die Etablierung der Infektion erschwert. Ein interessanter Ansatzpunkt wäre dabei generell herauszufinden, ob und wie Amöben bakterielles Flagellin detektieren können. Bezogen auf *L. pneumophila* sollte eine *proA*- und *flaA*-defiziente Doppelmutante generiert werden und Infektionsversuche unter Zusatz von gereinigtem ProA oder FlaA durchgeführt werden. Weiterhin sollte ein *proA*-Komplementationsstamm erzeugt werden, um die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse weiter zu bekräftigen. Dies gilt auch für die Aminopeptidase PepN, die hier als ein neuer Virulenzfaktor von *L. pneumophila* identifiziert werden konnte. In weiteren Studien sollte die genaue Funktion von PepN sowie sein Zusammenhang mit ProA analysiert werden.

ProA ist ein wichtiger Schlüsselfaktor für die Infektion der humanen Lunge. In weiterführenden Untersuchungen sollte, z.B. mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen, die genaue Lokalisierung der *proA*-defizienten Mutante während der HLTE-Infektion überprüft werden. So könnten Rückschlüsse auf eine möglicherweise schlechtere Ausbreitung im Gewebe, als es beim Wildtyp der Fall wäre, gezogen werden. Weiterhin wäre es interessant herauszufinden, ob ProA und Mip bei der Gewebeschädigung zusammen agieren. Dazu sollte eine *proA*- und *mip*-defiziente Doppelmutante erstellt werden und in der HLTE-Infektion die Gewebeschädigung mit und ohne Zugabe von gereinigtem ProA betrachtet werden. Weiterhin wäre auch die genaue Lokalisation von ProA bei der Infektion sinnvoll. Besonders wichtig ist auch die Identifizierung der ProA-Ziele im Gewebe. Bisher ist für ProA nur eine Kollagen-abbauende Eigenschaft bestätigt. Mögliche weitere Substrate im Lungengewebe wären z.B. Laminin, Fibronectin, Proteoglykan, Thrombospondin und Vitronectin.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ProA monomeres FlaA spaltet, dadurch die TLR5-Aktivierung verhindert und auch die CXCL8-Produktion beeinflusst. Aufgrund der starken Abhängigkeit vom Zustand des Lungengewebes, konnten bisher nur

6 Diskussion

zwei aussagekräftige Replikate bei der CXCL8-Messung im Zusammenhang mit der *L. pneumophila*-Infektion analysiert werden. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, sollten hier weitere Replikate erstellt werden. Weiterhin sollten die Folgen dieses Eingriffs von ProA in die Immunantwort genauer betrachtet werden. Dazu könnte z.B. die Einwanderung von Immunzellen wie PMNs oder Makrophagen in infizierten HLTEs unter Anwendung immunhistochemischer Methoden untersucht werden. Da ProA die CXCL8-Produktion verändert, scheint die Spaltung von FlaA insbesondere die Immunantwort der Lungenepithelzellen zu betreffen. Jedoch ist TLR5 auch auf alveolaren Makrophagen präsent. Daher sollte in weiteren Studien der Einfluss von ProA auf die Immunantwort der einzelnen Zelltypen genauer charakterisiert werden. Weiterhin wäre ein direkter Abbau von produzierten Cytokinen und Chemokinen durch ProA selbst möglich, was in Degradationsversuchen mit gereinigtem ProA und den entsprechenden Botenstoffen überprüft werden könnte.

7 Literaturverzeichnis

- D. H. Abdelaziz, M. A. Gavrilin, A. Akhter, K. Caution, S. Kotrange, A. A. Khweek, B. A. Abdulrahman, J. Grandhi, Z. A. Hassan, C. Marsh, M. D. Wewers, and A. O. Amer. Apoptosis-associated speck-like protein (ASC) controls *Legionella pneumophila* infection in human monocytes. *J. Biol. Chem.*, 286(5):3203–3208, Feb 2011.
- Y. Abu Kwaik, L. Y. Gao, B. J. Stone, C. Venkataraman, and O. S. Harb. Invasion of protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(9):3127–3133, Sep 1998a.
- Y. Abu Kwaik, C. Venkataraman, O. S. Harb, and L. Y. Gao. Signal transduction in the protozoan host *Hartmannella vermiformis* upon attachment and invasion by *Legionella micdadei*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(9):3134–3139, Sep 1998b.
- A. Abu-Zant, R. Asare, J. E. Graham, and Y. Abu Kwaik. Role for RpoS but not RelA of *Legionella pneumophila* in modulation of phagosome biogenesis and adaptation to the phagosomal microenvironment. *Infect. Immun.*, 74(5):3021–3026, May 2006.
- A. Abu-Zant, S. Jones, R. Asare, J. Suttles, C. Price, J. Graham, and Y. A. Kwaik. Anti-apoptotic signalling by the Dot/Icm secretion system of *L. pneumophila*. *Cell. Microbiol.*, 9(1):246–264, Jan 2007.
- R. Adamo, S. Sokol, G. Soong, M. I. Gomez, and A. Prince. *Pseudomonas aeruginosa* flagella activate airway epithelial cells through asialoGM1 and toll-like receptor 2 as well as toll-like receptor 5. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 30(5):627–634, May 2004.
- D. G. Addiss, J. P. Davis, M. LaVenture, P. J. Wand, M. A. Hutchinson, and R. M. McKinney. Community-acquired Legionnaires' disease associated with a cooling tower: evidence for longer-distance transport of *Legionella pneumophila*. *Am. J. Epidemiol.*, 130(3):557–568, Sep 1989.
- A. Adlagatta, L. Gay, and B. W. Matthews. Structure of aminopeptidase N from *Escherichia coli* suggests a compartmentalized, gated active site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103(36):13339–13344, Sep 2006.
- A. A. Adeleke, B. S. Fields, R. F. Benson, M. I. Daneshvar, J. M. Pruckler, R. M. Ratcliff, T. G. Harrison, R. S. Weyant, R. J. Birtles, D. Raoult, and M. A. Halablab. *Legionella drozanskii* sp. nov., *Legionella rowbothamii* sp. nov. and *Legionella fallonii* sp. nov.: three unusual new *Legionella* species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51(Pt 3):1151–1160, May 2001.
- A. Agrawal and B. Pulendran. Anthrax lethal toxin: a weapon of multisystem destruction. *Cell. Mol. Life Sci.*, 61(22):2859–2865, Nov 2004.
- M. Akamine, F. Higa, N. Arakaki, K. Kawakami, K. Takeda, S. Akira, and A. Saito. Differential roles of Toll-like receptors 2 and 4 in in vitro responses of macrophages to *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.*, 73(1):352–361, Jan 2005.

7 Literaturverzeichnis

- M. Akamine, F. Higa, S. Haranaga, M. Tateyama, N. Mori, K. Heuner, and J. Fujita. Interferon-gamma reverses the evasion of Birc1e/Naip5 gene mediated murine macrophage immunity by *Legionella pneumophila* mutant lacking flagellin. *Microbiol. Immunol.*, 51(3):279–287, 2007.
- A. Akhter, M. A. Gavrilin, L. Frantz, S. Washington, C. Ditty, D. Limoli, C. Day, A. Sarkar, C. Newland, J. Butchar, C. B. Marsh, M. D. Wewers, S. Tridandapani, T. D. Kanneganti, and A. O. Amer. Caspase-7 activation by the Nlrc4/Ipafl inflammasome restricts *Legionella pneumophila* infection. *PLoS Pathog.*, 5(4):e1000361, Apr 2009.
- S. Akira. TLR signaling. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 311:1–16, 2006.
- S. Al-Khodori, S. Kalachikov, I. Morozova, C. T. Price, and Y. Abu Kwaik. The PmrA/PmrB two-component system of *Legionella pneumophila* is a global regulator required for intracellular replication within macrophages and protozoa. *Infect. Immun.*, 77(1):374–386, Jan 2009.
- T. Al-Quadani, C. T. Price, and Y. Abu Kwaik. Exploitation of evolutionarily conserved amoeba and mammalian processes by *Legionella*. *Trends Microbiol.*, 20(6):299–306, Jun 2012.
- C. Albert-Weissenberger, T. Sahr, O. Sismeiro, J. Hacker, K. Heuner, and C. Buchrieser. Control of flagellar gene regulation in *Legionella pneumophila* and its relation to growth phase. *J. Bacteriol.*, 192(2):446–455, Jan 2010.
- K. A. Allard, V. K. Viswanathan, and N. P. Cianciotto. IbtA and IbtB are required for production of the *Legionella pneumophila* siderophore legiobactin. *J. Bacteriol.*, 188(4):1351–1363, Feb 2006.
- K. A. Allard, J. Dao, P. Sanjeevaiah, K. McCoy-Simandle, C. H. Chatfield, D. S. Crumrine, D. Castignetti, and N. P. Cianciotto. Purification of Legiobactin and importance of this siderophore in lung infection by *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.*, 77(7):2887–2895, Jul 2009.
- L. Alleron, A. Khemiri, M. Koubar, C. Lacombe, L. Coquet, P. Cosette, T. Jouenne, and J. Frere. VBNC *Legionella pneumophila* cells are still able to produce virulence proteins. *Water Res.*, 47(17):6606–6617, Nov 2013.
- O. A. Alli, S. Zink, N. K. von Lackum, and Y. Abu-Kwaik. Comparative assessment of virulence traits in *Legionella* spp. *Microbiology (Reading, Engl.)*, 149(Pt 3):631–641, Mar 2003.
- C. Allison, N. Coleman, P. L. Jones, and C. Hughes. Ability of *Proteus mirabilis* to invade human urothelial cells is coupled to motility and swarming differentiation. *Infect. Immun.*, 60(11):4740–4746, Nov 1992.
- F. Altegoer, J. Schuhmacher, P. Pausch, and G. Bange. From molecular evolution to biobricks and synthetic modules: a lesson by the bacterial flagellum. *Biotechnol. Eng. Rev.*, 30(1-2):49–64, Oct 2014.

- E. Altman and G. Segal. The response regulator CpxR directly regulates expression of several *Legionella pneumophila* *icm/dot* components as well as new translocated substrates. *J. Bacteriol.*, 190(6):1985–1996, Mar 2008.
- J. Amemura-Maekawa, F. Kura, B. Chang, A. Suzuki-Hashimoto, M. Ichinose, T. Endo, and H. Watanabe. Distinct difference of *flaA* genotypes of *Legionella pneumophila* between isolates from bath water and cooling tower water. *Microbiol. Immunol.*, 52(9):460–464, Sep 2008.
- P. S. Amenta, J. Gil, and A. Martinez-Hernandez. Connective tissue of rat lung. II: Ultrastructural localization of collagen types III, IV, and VI. *J. Histochem. Cytochem.*, 36(9):1167–1173, Sep 1988.
- A. Amer, L. Franchi, T. D. Kanneganti, M. Body-Malapel, N. Ozoren, G. Brady, S. Meshinchi, R. Jagirdar, A. Gewirtz, S. Akira, and G. Nunez. Regulation of *Legionella* phagosome maturation and infection through flagellin and host Ipaf. *J. Biol. Chem.*, 281(46):35217–35223, Nov 2006.
- S. Appelt and K. Heuner. The Flagellar Regulon of *Legionella* - A Review. *Front Cell Infect Microbiol.*, 7:454, 2017.
- K. A. Archer and C. R. Roy. MyD88-dependent responses involving Toll-like receptor 2 are important for protection and clearance of *Legionella pneumophila* in a mouse model of Legionnaires’ disease. *Infect. Immun.*, 74(6):3325–3333, Jun 2006.
- K. A. Archer, L. Alexopoulou, R. A. Flavell, and C. R. Roy. Multiple MyD88-dependent responses contribute to pulmonary clearance of *Legionella pneumophila*. *Cell. Microbiol.*, 11(1):21–36, Jan 2009.
- K. A. Archer, F. Ader, K. S. Kobayashi, R. A. Flavell, and C. R. Roy. Cooperation between multiple microbial pattern recognition systems is important for host protection against the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.*, 78(6):2477–2487, Jun 2010.
- R. M. Atlas. *Legionella*: from environmental habitats to disease pathology, detection and control. *Environ. Microbiol.*, 1(4):283–293, Aug 1999.
- P. Aurass, M. Schlegel, O. Metwally, C. R. Harding, G. N. Schroeder, G. Frankel, and A. Flieger. The *Legionella pneumophila* Dot/Icm-secreted effector PlcC/CegC1 together with PlcA and PlcB promotes virulence and belongs to a novel zinc metallophospholipase C family present in bacteria and fungi. *J. Biol. Chem.*, 288(16):11080–11092, Apr 2013.
- A. O. Azghani, E. J. Miller, and B. T. Peterson. Virulence factors from *Pseudomonas aeruginosa* increase lung epithelial permeability. *Lung*, 178(5):261–269, 2000.
- M. A. Bachman and M. S. Swanson. RpoS co-operates with other factors to induce *Legionella pneumophila* virulence in the stationary phase. *Mol. Microbiol.*, 40(5):1201–1214, Jun 2001.

7 Literaturverzeichnis

- M. A. Bachman and M. S. Swanson. Genetic evidence that *Legionella pneumophila* RpoS modulates expression of the transmission phenotype in both the exponential phase and the stationary phase. *Infect. Immun.*, 72(5):2468–2476, May 2004.
- M. Baggiolini, B. Dewald, and B. Moser. Human chemokines: an update. *Annu. Rev. Immunol.*, 15: 675–705, 1997.
- P. Bandyopadhyay and H. M. Steinman. *Legionella pneumophila* catalase-peroxidases: cloning of the *katB* gene and studies of KatB function. *J. Bacteriol.*, 180(20):5369–5374, Oct 1998.
- P. Bandyopadhyay and H. M. Steinman. Catalase-peroxidases of *Legionella pneumophila*: cloning of the *katA* gene and studies of KatA function. *J. Bacteriol.*, 182(23):6679–6686, Dec 2000.
- P. Bandyopadhyay, S. Liu, C. B. Gabbai, Z. Venitelli, and H. M. Steinman. Environmental mimics and the Lvh type IVA secretion system contribute to virulence-related phenotypes of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.*, 75(2):723–735, Feb 2007.
- P. Bandyopadhyay, E. A. Lang, K. S. Rasaputra, and H. M. Steinman. Implication of the VirD4 coupling protein of the Lvh type 4 secretion system in virulence phenotypes of *Legionella pneumophila*. *J. Bacteriol.*, 195(15):3468–3475, Aug 2013.
- S. Banerji, M. Bewersdorff, B. Hermes, N. P. Cianciotto, and A. Flieger. Characterization of the major secreted zinc metalloprotease-dependent glycerophospholipid:cholesterol acyltransferase, PlaC, of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.*, 73(5):2899–2909, May 2005.
- B. W. Bardoel, S. van der Ent, M. J. Pel, J. Tommassen, C. M. Pieterse, K. P. van Kessel, and J. A. van Strijp. *Pseudomonas* evades immune recognition of flagellin in both mammals and plants. *PLoS Pathog.*, 7(8):e1002206, Aug 2011.
- J. Barker and D. H. Till. Survival of *Legionella pneumophila*. *Med Lab Sci*, 43(4):388–389, Oct 1986.
- J. Barker, I. D. Farrell, and J. G. Hutchison. Factors affecting growth of *Legionella pneumophila* in liquid media. *J. Med. Microbiol.*, 22(2):97–100, Sep 1986.
- J. Barker, M. R. Brown, P. J. Collier, I. Farrell, and P. Gilbert. Relationship between *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba polyphaga*: physiological status and susceptibility to chemical inactivation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58(8):2420–2425, Aug 1992.
- A. Baskerville, J. W. Conlan, L. A. Ashworth, and A. B. Dowsett. Pulmonary damage caused by a protease from *Legionella pneumophila*. *Br J Exp Pathol*, 67(4):527–536, Aug 1986.
- M. C. Beckers, S. Yoshida, K. Morgan, E. Skamene, and P. Gros. Natural resistance to infection with *Legionella pneumophila*: chromosomal localization of the *LgnI* susceptibility gene. *Mamm. Genome*, 6(8):540–545, Aug 1995.

- C. Bellinger-Kawahara and M. A. Horwitz. Complement component C3 fixes selectively to the major outer membrane protein (MOMP) of *Legionella pneumophila* and mediates phagocytosis of liposome-MOMP complexes by human monocytes. *J. Exp. Med.*, 172(4):1201–1210, Oct 1990.
- C. J. Belunis, T. Clementz, S. M. Carty, and C. R. Raetz. Inhibition of lipopolysaccharide biosynthesis and cell growth following inactivation of the *kdtA* gene in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 270(46):27646–27652, Nov 1995.
- A. L. Benin, R. F. Benson, and R. E. Besser. Trends in legionnaires disease, 1980-1998: declining mortality and new patterns of diagnosis. *Clin. Infect. Dis.*, 35(9):1039–1046, Nov 2002.
- R. F. Benson and B. S. Fields. Classification of the genus *Legionella*. *Semin Respir Infect*, 13(2):90–99, Jun 1998.
- B. P. Berdal and K. Fossum. Occurrence and immunogenicity of proteinases from *Legionella* species. *Eur. J. Clin. Microbiol.*, 1(1):7–11, Feb 1982.
- B. P. Berdal, O. Hushovd, O. Olsvik, O. R. odegard, and T. Bergan. Demonstration of extracellular proteolytic enzymes from *Legionella* species strains by using synthetic chromogenic peptide substrates. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand B*, 90(2):119–123, Apr 1982a.
- B. P. Berdal, O. Olsvik, S. Myhre, and T. Omland. Demonstration of extracellular chymotrypsin-like activity from various *Legionella* species. *J. Clin. Microbiol.*, 16(3):452–457, Sep 1982b.
- H. C. Berg. The rotary motor of bacterial flagella. *Annu. Rev. Biochem.*, 72:19–54, 2003.
- H. C. Berg and R. A. Anderson. Bacteria swim by rotating their flagellar filaments. *Nature*, 245(5425):380–382, Oct 1973.
- K. H. Berger and R. R. Isberg. Two distinct defects in intracellular growth complemented by a single genetic locus in *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbiol.*, 7(1):7–19, Jan 1993.
- W. R. Berrington, R. Iyer, R. D. Wells, K. D. Smith, S. J. Skerrett, and T. R. Hawn. NOD1 and NOD2 regulation of pulmonary innate immunity to *Legionella pneumophila*. *Eur. J. Immunol.*, 40(12):3519–3527, Dec 2010.
- S. Berthoumieux, H. de Jong, G. Baptist, C. Pinel, C. Ranquet, D. Ropers, and J. Geiselmann. Shared control of gene expression in bacteria by transcription factors and global physiology of the cell. *Mol. Syst. Biol.*, 9:634, 2013.
- A. D. Berti, N. J. Greve, Q. H. Christensen, and M. G. Thomas. Identification of a biosynthetic gene cluster and the six associated lipopeptides involved in swarming motility of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *J. Bacteriol.*, 189(17):6312–6323, Sep 2007.
- U. Bhan, G. Trujillo, K. Lyn-Kew, M. W. Newstead, X. Zeng, C. M. Hogaboam, A. M. Krieg, and T. J. Standiford. Toll-like receptor 9 regulates the lung macrophage phenotype and host immunity in murine pneumonia caused by *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.*, 76(7):2895–2904, Jul 2008.

7 Literaturverzeichnis

- T. Binz and A. Rummel. Cell entry strategy of clostridial neurotoxins. *J. Neurochem.*, 109(6):1584–1595, Jun 2009.
- W. J. Black, F. D. Quinn, and L. S. Tompkins. *Legionella pneumophila* zinc metalloprotease is structurally and functionally homologous to *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *J. Bacteriol.*, 172(5):2608–2613, May 1990.
- S. J. Blander, L. Szeto, H. A. Shuman, and M. A. Horwitz. An immunoprotective molecule, the major secretory protein of *Legionella pneumophila*, is not a virulence factor in a guinea pig model of Legionnaires' disease. *J. Clin. Invest.*, 86(3):817–824, Sep 1990.
- S. P. Blatt, M. D. Parkinson, E. Pace, P. Hoffman, D. Dolan, P. Lauderdale, R. A. Zajac, and G. P. Melcher. Nosocomial Legionnaires' disease: aspiration as a primary mode of disease acquisition. *Am. J. Med.*, 95(1):16–22, Jul 1993.
- W. Bode, F. X. Gomis-Ruth, and W. Stockler. Astacins, serralyisins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS Lett.*, 331(1-2):134–140, Sep 1993.
- P. Borella, E. Guerrieri, I. Marchesi, M. Bondi, and P. Messi. Water ecology of *Legionella* and protozoan: environmental and public health perspectives. *Biotechnol Annu Rev*, 11:355–380, 2005.
- S. C. Bosshardt, R. F. Benson, and B. S. Fields. Flagella are a positive predictor for virulence in *Legionella*. *Microb. Pathog.*, 23(2):107–112, Aug 1997.
- J. A. Bozue and W. Johnson. Interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii*: uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome-lysosome fusion. *Infect. Immun.*, 64(2):668–673, Feb 1996.
- S. Bozzaro, S. Buracco, and B. Peracino. Iron metabolism and resistance to infection by invasive bacteria in the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Front Cell Infect Microbiol*, 3:50, 2013.
- A. K. Brassinga and C. D. Sifri. The *Caenorhabditis elegans* model of *Legionella* infection. *Methods Mol. Biol.*, 954:439–461, 2013.
- P. Braun, A. de Groot, W. Bitter, and J. Tommassen. Secretion of elastinolytic enzymes and their propeptides by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 180(13):3467–3469, Jul 1998.
- R. F. Breiman and J. C. Butler. Legionnaires' disease: clinical, epidemiological, and public health perspectives. *Semin Respir Infect*, 13(2):84–89, Jun 1998.
- R. F. Breiman, W. Cozen, B. S. Fields, T. D. Mastro, S. J. Carr, J. S. Spika, and L. Mascola. Role of air sampling in investigation of an outbreak of legionnaires' disease associated with exposure to aerosols from an evaporative condenser. *J. Infect. Dis.*, 161(6):1257–1261, Jun 1990.

- H. Brüggemann, C. Cazalet, and C. Buchrieser. Adaptation of *Legionella pneumophila* to the host environment: role of protein secretion, effectors and eukaryotic-like proteins. *Curr. Opin. Microbiol.*, 9(1):86–94, Feb 2006.
- M. Broich, K. Rydzewski, T. L. McNealy, R. Marre, and A. Flieger. The global regulatory proteins LetA and RpoS control phospholipase A, lysophospholipase A, acyltransferase, and other hydrolytic activities of *Legionella pneumophila* JR32. *J. Bacteriol.*, 188(4):1218–1226, Feb 2006.
- I. I. Brown and C. C. Hase. Flagellum-independent surface migration of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 183(12):3784–3790, Jun 2001.
- J. M. Brunkard, E. Ailes, V. A. Roberts, V. Hill, E. D. Hilborn, G. F. Craun, A. Rajasingham, A. Kahler, L. Garrison, L. Hicks, J. Carpenter, T. J. Wade, M. J. Beach, and J. S. Yoder Msw. Surveillance for waterborne disease outbreaks associated with drinking water—United States, 2007–2008. *MMWR Surveill Summ*, 60(12):38–68, Sep 2011.
- T. F. Byrd and M. A. Horwitz. Interferon gamma-activated human monocytes downregulate transferrin receptors and inhibit the intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* by limiting the availability of iron. *J. Clin. Invest.*, 83(5):1457–1465, May 1989.
- T. F. Byrd and M. A. Horwitz. Lactoferrin inhibits or promotes *Legionella pneumophila* intracellular multiplication in nonactivated and interferon gamma-activated human monocytes depending upon its degree of iron saturation. Iron-lactoferrin and nonphysiologic iron chelates reverse monocyte activation against *Legionella pneumophila*. *J. Clin. Invest.*, 88(4):1103–1112, Oct 1991a.
- T. F. Byrd and M. A. Horwitz. Chloroquine inhibits the intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* by limiting the availability of iron. A potential new mechanism for the therapeutic effect of chloroquine against intracellular pathogens. *J. Clin. Invest.*, 88(1):351–357, Jul 1991b.
- B. Byrne and M. S. Swanson. Expression of *Legionella pneumophila* virulence traits in response to growth conditions. *Infect. Immun.*, 66(7):3029–3034, Jul 1998.
- N. C. Caiazza, R. M. Shanks, and G. A. O’Toole. Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 187(21):7351–7361, Nov 2005.
- A. A. Campbell, J. C. Slaughter, and R. J. Sturgeon. Inhibition of proteinase B and stabilisation of malate dehydrogenase in extracts of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by turkey egg white fraction II-T. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 41:449–453, 1995.
- G. Candiano, M. Bruschi, L. Musante, L. Santucci, G. M. Ghiggeri, B. Carnemolla, P. Orecchia, L. Zardi, and P. G. Righetti. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, 25(9):1327–1333, May 2004.
- I. M. Carroll and N. Maharshak. Enteric bacterial proteases in inflammatory bowel disease- pathophysiology and clinical implications. *World J. Gastroenterol.*, 19(43):7531–7543, 2013.

7 Literaturverzeichnis

- J. A. Carson, T. Ansai, S. Awano, W. Yu, T. Takehara, and A. J. Turner. Characterization of PgPepO, a bacterial homologue of endothelin-converting enzyme-1. *Clin. Sci.*, 103 Suppl 48:90S–93S, Aug 2002.
- M. Carson, D. H. Johnson, H. McDonald, C. Brouillette, and L. J. Delucas. His-tag impact on structure. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 63(Pt 3):295–301, Mar 2007.
- C. L. Case, S. Shin, and C. R. Roy. Asc and Ipaf Inflammasomes direct distinct pathways for caspase-1 activation in response to *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.*, 77(5):1981–1991, May 2009.
- F. Casilag, A. Lorenz, J. Krueger, F. Klawonn, S. Weiss, and S. Haussler. The LasB Elastase of *Pseudomonas aeruginosa* Acts in Concert with Alkaline Protease AprA To Prevent Flagellin-Mediated Immune Recognition. *Infect. Immun.*, 84(1):162–171, Oct 2015.
- C. Cazalet, C. Rusniok, H. Bruggemann, N. Zidane, A. Magnier, L. Ma, M. Tichit, S. Jarraud, C. Bouchier, F. Vandenesch, F. Kunst, J. Etienne, P. Glaser, and C. Buchrieser. Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. *Nat. Genet.*, 36(11):1165–1173, Nov 2004.
- D. Chandu and D. Nandi. PepN is the major aminopeptidase in *Escherichia coli*: insights on substrate specificity and role during sodium-salicylate-induced stress. *Microbiology (Reading, Engl.)*, 149(Pt 12):3437–3447, Dec 2003.
- X. Charpentier, J. E. Gabay, M. Reyes, J. W. Zhu, A. Weiss, and H. A. Shuman. Chemical genetics reveals bacterial and host cell functions critical for type IV effector translocation by *Legionella pneumophila*. *PLoS Pathog.*, 5(7):e1000501, Jul 2009.
- C. H. Chatfield, B. J. Mulhern, V. K. Viswanathan, and N. P. Cianciotto. The major facilitator superfamily-type protein LbtC promotes the utilization of the legiobactin siderophore by *Legionella pneumophila*. *Microbiology (Reading, Engl.)*, 158(Pt 3):721–735, Mar 2012.
- A. L. Chen, K. A. Johnson, J. K. Lee, C. Sutterlin, and M. Tan. CPAF: a Chlamydial protease in search of an authentic substrate. *PLoS Pathog.*, 8(8):e1002842, 2012.
- S. Chen, M. Beeby, G. E. Murphy, J. R. Leadbetter, D. R. Hendrixson, A. Briegel, Z. Li, J. Shi, E. I. Tocheva, A. Muller, M. J. Dobro, and G. J. Jensen. Structural diversity of bacterial flagellar motors. *EMBO J.*, 30(14):2972–2981, Jun 2011.
- M. Chien, I. Morozova, S. Shi, H. Sheng, J. Chen, S. M. Gomez, G. Asamani, K. Hill, J. Nuara, M. Feder, J. Rineer, J. J. Greenberg, V. Steshenko, S. H. Park, B. Zhao, E. Teplitskaya, J. R. Edwards, S. Pampou, A. Georghiou, I. C. Chou, W. Iannuccilli, M. E. Ulz, D. H. Kim, A. Geringer-Sameth, C. Goldsberry, P. Morozov, S. G. Fischer, G. Segal, X. Qu, A. Rzhetsky, P. Zhang, E. Cayanis, P. J. De Jong, J. Ju, S. Kalachikov, H. A. Shuman, and J. J. Russo. The genomic sequence of the accidental pathogen *Legionella pneumophila*. *Science*, 305(5692):1966–1968, Sep 2004.

- Y. H. Chiu, J. B. Macmillan, and Z. J. Chen. RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell*, 138(3):576–591, Aug 2009.
- A. Chong, C. A. Lima, D. S. Allan, G. K. Nasrallah, and R. A. Garduño. The purified and recombinant *Legionella pneumophila* chaperonin alters mitochondrial trafficking and microfilament organization. *Infect. Immun.*, 77(11):4724–4739, Nov 2009.
- N. P. Cianciotto. Iron acquisition by *Legionella pneumophila*. *Biometals*, 20(3-4):323–331, Jun 2007.
- N. P. Cianciotto. Many substrates and functions of type II secretion: lessons learned from *Legionella pneumophila*. *Future Microbiol.*, 4(7):797–805, Sep 2009.
- N. P. Cianciotto. Type II secretion and *Legionella* virulence. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 376: 81–102, 2013.
- N. P. Cianciotto, J. M. Bangsberg, B. I. Eisenstein, and N. C. Engleberg. Identification of *mip*-like genes in the genus *Legionella*. *Infect. Immun.*, 58(9):2912–2918, Sep 1990a.
- N. P. Cianciotto, B. I. Eisenstein, C. H. Mody, and N. C. Engleberg. A mutation in the *mip* gene results in an attenuation of *Legionella pneumophila* virulence. *J. Infect. Dis.*, 162(1):121–126, Jul 1990b.
- N. P. Cianciotto, J. K. Stamos, and D. W. Kamp. Infectivity of *Legionella pneumophila* *mip* mutant for alveolar epithelial cells. *Curr. Microbiol.*, 30(4):247–250, Apr 1995.
- S. L. Cirillo, J. Lum, and J. D. Cirillo. Identification of novel loci involved in entry by *Legionella pneumophila*. *Microbiology (Reading, Engl.)*, 146 (Pt 6):1345–1359, Jun 2000.
- S. L. Cirillo, L. Yan, M. Littman, M. M. Samrakandi, and J. D. Cirillo. Role of the *Legionella pneumophila* *rtxA* gene in amoebae. *Microbiology (Reading, Engl.)*, 148(Pt 6):1667–1677, Jun 2002.
- L. M. Cobb, J. C. Mychaleckyj, D. J. Wozniak, and Y. S. Lopez-Boado. *Pseudomonas aeruginosa* flagellin and alginate elicit very distinct gene expression patterns in airway epithelial cells: implications for cystic fibrosis disease. *J. Immunol.*, 173(9):5659–5670, Nov 2004.
- J. Coers, R. E. Vance, M. F. Fontana, and W. F. Dietrich. Restriction of *Legionella pneumophila* growth in macrophages requires the concerted action of cytokine and Naip5/Ipaf signalling pathways. *Cell. Microbiol.*, 9(10):2344–2357, Oct 2007.
- D. A. Coil and J. Anne. Twitching motility in *Legionella pneumophila*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 293(2): 271–277, Apr 2009.
- P. M. Colman, J. N. Jansonius, and B. W. Matthews. The structure of thermolysin: an electron density map at 2-3 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 70(3):701–724, Oct 1972.
- M. Comellas-Bigler, R. Lang, W. Bode, and K. Maskos. Crystal structure of the *E. coli* dipeptidyl carboxypeptidase Dcp: further indication of a ligand-dependent hinge movement mechanism. *J. Mol. Biol.*, 349(1):99–112, May 2005.

7 Literaturverzeichnis

- J. W. Conlan, A. Baskerville, and L. A. Ashworth. Separation of *Legionella pneumophila* proteases and purification of a protease which produces lesions like those of Legionnaires' disease in guinea pig lung. *J. Gen. Microbiol.*, 132(6):1565–1574, Jun 1986.
- J. W. Conlan, A. Williams, and L. A. Ashworth. Inactivation of human alpha-1-antitrypsin by a tissue-destructive protease of *Legionella pneumophila*. *J. Gen. Microbiol.*, 134(2):481–487, Feb 1988a.
- J. W. Conlan, A. Williams, and L. A. Ashworth. In vivo production of a tissue-destructive protease by *Legionella pneumophila* in the lungs of experimentally infected guinea-pigs. *J. Gen. Microbiol.*, 134(1):143–149, Jan 1988b.
- C. A. Conlin and C. G. Miller. Cloning and nucleotide sequence of *opdA*, the gene encoding oligopeptidase A in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, 174(5):1631–1640, Mar 1992.
- C. A. Conlin and C. G. Miller. *opdA*, a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium gene encoding a protease, is part of an operon regulated by heat shock. *J. Bacteriol.*, 182(2):518–521, Jan 2000.
- M. B. Connelly, G. M. Young, and A. Sloma. Extracellular proteolytic activity plays a central role in swarming motility in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 186(13):4159–4167, Jul 2004.
- B. D. Corbin, E. H. Seeley, A. Raab, J. Feldmann, M. R. Miller, V. J. Torres, K. L. Anderson, B. M. Dattilo, P. M. Dunman, R. Gerads, R. M. Caprioli, W. Nacken, W. J. Chazin, and E. P. Skaar. Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses. *Science*, 319(5865):962–965, Feb 2008.
- C. S. Craik, M. J. Page, and E. L. Madison. Proteases as therapeutics. *Biochem. J.*, 435(1):1–16, Apr 2011.
- S. L. Currie, T. K. Beattie, C. W. Knapp, and D. S. Lindsay. *Legionella* spp. in UK composts—a potential public health issue? *Clin. Microbiol. Infect.*, 20(4):O224–229, Apr 2014.
- J. A. Daisy, C. E. Benson, J. McKittrick, and H. M. Friedman. Intracellular replication of *Legionella pneumophila*. *J. Infect. Dis.*, 143(3):460–464, Mar 1981.
- Z. D. Dalebroux, R. L. Edwards, and M. S. Swanson. SpoT governs *Legionella pneumophila* differentiation in host macrophages. *Mol. Microbiol.*, 71(3):640–658, Feb 2009.
- Z. D. Dalebroux, B. F. Yagi, T. Sahr, C. Buchrieser, and M. S. Swanson. Distinct roles of ppGpp and DksA in *Legionella pneumophila* differentiation. *Mol. Microbiol.*, 76(1):200–219, Apr 2010.
- N. Dasgupta, M. C. Wolfgang, A. L. Goodman, S. K. Arora, J. Jyot, S. Lory, and R. Ramphal. A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.*, 50(3):809–824, Nov 2003.
- G. D'Auria, N. Jimenez, F. Peris-Bondia, C. Pelaz, A. Latorre, and A. Moya. Virulence factor *rtx* in *Legionella pneumophila*, evidence suggesting it is a modular multifunctional protein. *BMC Genomics*, 9:14, Jan 2008.

- M. E. Davey, N. C. Caiazza, and G. A. O'Toole. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.*, 185(3):1027–1036, Feb 2003.
- J. M. Davidson. Biochemistry and turnover of lung interstitium. *Eur. Respir. J.*, 3(9):1048–1063, Oct 1990.
- E. De Buck, L. Maes, E. Meyen, L. Van Mellaert, N. Geukens, J. Anne, and E. Lammertyn. *Legionella pneumophila* Philadelphia-1 tatB and tatC affect intracellular replication and biofilm formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 331(4):1413–1420, Jun 2005.
- S. Debroy, V. Aragon, S. Kurtz, and N. P. Cianciotto. *Legionella pneumophila* Mip, a surface-exposed peptidylproline cis-trans-isomerase, promotes the presence of phospholipase C-like activity in culture supernatants. *Infect. Immun.*, 74(9):5152–5160, Sep 2006.
- S. DebRoy, J. Dao, M. Soderberg, O. Rossier, and N. P. Cianciotto. *Legionella pneumophila* type II secretome reveals unique exoproteins and a chitinase that promotes bacterial persistence in the lung. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103(50):19146–19151, Dec 2006.
- P. Declerck. Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*. *Environ. Microbiol.*, 12(3):557–566, Mar 2010.
- P. Declerck, J. Behets, A. Margineanu, V. van Hoef, B. De Keersmaecker, and F. Ollevier. Replication of *Legionella pneumophila* in biofilms of water distribution pipes. *Microbiol. Res.*, 164(6):593–603, 2009.
- P. Delgado-Viscogliosi, T. Simonart, V. Parent, G. Marchand, M. Dobbelaere, E. Pierlot, V. Pierzo, F. Menard-Szczebara, E. Gaudard-Ferveur, K. Delabre, and J. M. Delattre. Rapid method for enumeration of viable *Legionella pneumophila* and other *Legionella spp.* in water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(7):4086–4096, Jul 2005.
- J. W. den Boer, I. H. Friesema, and J. D. Hooi. Reported cases of *Legionella pneumonia* in the Netherlands, 1987-2000. *Ned Tijdschr Geneeskd*, 146(7):315–320, Feb 2002.
- J. W. Den Boer, L. Verhoef, M. A. Bencini, J. P. Bruin, R. Jansen, and E. P. Yzerman. Outbreak detection and secondary prevention of Legionnaires' disease: a national approach. *Int J Hyg Environ Health*, 210(1):1–7, Jan 2007.
- I. Derre and R. R. Isberg. Macrophages from mice with the restrictive *LgnI* allele exhibit multifactorial resistance to *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.*, 72(11):6221–6229, Nov 2004.
- M. A. Dessau and Y. Modis. Protein crystallization for X-ray crystallography. *J Vis Exp*, (47), Jan 2011.
- U. Dickgiesser, H. E. Müller, G. Bohm, and D. Fritsche. *Legionella pneumophila* pneumonia masked by simultaneous demonstration of further non-specific pneumonia pathogens. *Infection*, 13(5):231–234, 1985.

7 Literaturverzeichnis

- B. M. Diederer. *Legionella* spp. and Legionnaires' disease. *J. Infect.*, 56(1):1–12, Jan 2008.
- C. Dietrich, K. Heuner, B. C. Brand, J. Hacker, and M. Steinert. Flagellum of *Legionella pneumophila* positively affects the early phase of infection of eukaryotic host cells. *Infect. Immun.*, 69(4):2116–2122, Apr 2001.
- W. F. Dietrich, D. M. Damron, R. R. Isberg, E. S. Lander, and M. S. Swanson. *Lgn1*, a gene that determines susceptibility to *Legionella pneumophila*, maps to mouse chromosome 13. *Genomics*, 26(3):443–450, Apr 1995.
- E. Diez, S. H. Lee, S. Gauthier, Z. Yaraghi, M. Tremblay, S. Vidal, and P. Gros. *Birc1e* is the gene within the *Lgn1* locus associated with resistance to *Legionella pneumophila*. *Nat. Genet.*, 33(1):55–60, Jan 2003.
- R. N. Doetsch and R. D. Sjöblad. Flagellar structure and function in eubacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 34:69–108, 1980.
- M. S. Dorer, D. Kirton, J. S. Bader, and R. R. Isberg. RNA interference analysis of *Legionella* in *Drosophila* cells: exploitation of early secretory apparatus dynamics. *PLoS Pathog.*, 2(4):e34, Apr 2006.
- G. Döring, H. J. Obernesser, and K. Botzenhart. Extracellular toxins of *Pseudomonas aeruginosa*. II. Effect of two proteases on human immunoglobulins IgG, IgA and secretory IgA. *Zentralbl Bakteriologie A*, 249(1):89–98, Mar 1981.
- P. S. Doyle, Y. M. Zhou, J. C. Engel, and J. H. McKerrow. A cysteine protease inhibitor cures Chagas' disease in an immunodeficient-mouse model of infection. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51(11):3932–3939, Nov 2007.
- D. Drake and T. C. Montie. Flagella, motility and invasive virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Microbiol.*, 134(1):43–52, Jan 1988.
- L. A. Dreyfus and B. H. Iglewski. Purification and characterization of an extracellular protease of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.*, 51(3):736–743, Mar 1986.
- A. Ducret, M. Chabalier, and S. Dukan. Characterization and resuscitation of 'non-culturable' cells of *Legionella pneumophila*. *BMC Microbiol.*, 14:3, Jan 2014.
- L. Eckmann, M. F. Kagnoff, and J. Fierer. Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. *Infect. Immun.*, 61(11):4569–4574, Nov 1993.
- P. H. Edelstein. Improved semiselective medium for isolation of *Legionella pneumophila* from contaminated clinical and environmental specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 14(3):298–303, Sep 1981.
- P. H. Edelstein. Urine antigen tests positive for Pontiac fever: implications for diagnosis and pathogenesis. *Clin. Infect. Dis.*, 44(2):229–231, Jan 2007.

- P. H. Edelstein, M. A. Edelstein, F. Higa, and S. Falkow. Discovery of virulence genes of *Legionella pneumophila* by using signature tagged mutagenesis in a guinea pig pneumonia model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96(14):8190–8195, Jul 1999.
- J. A. Elliott and W. Johnson. Immunological and biochemical relationships among flagella isolated from *Legionella pneumophila* serogroups 1, 2, and 3. *Infect. Immun.*, 33(2):602–610, Aug 1981.
- M. Erhardt, H. M. Singer, D. H. Wee, J. P. Keener, and K. T. Hughes. An infrequent molecular ruler controls flagellar hook length in *Salmonella enterica*. *EMBO J.*, 30(14):2948–2961, Jun 2011.
- E. Eylert, V. Herrmann, M. Jules, N. Gillmaier, M. Lautner, C. Buchrieser, W. Eisenreich, and K. Heuner. Isotopologue profiling of *Legionella pneumophila*: role of serine and glucose as carbon substrates. *J. Biol. Chem.*, 285(29):22232–22243, Jul 2010.
- R. C. Fernandez, S. M. Logan, S. H. Lee, and P. S. Hoffman. Elevated levels of *Legionella pneumophila* stress protein Hsp60 early in infection of human monocytes and L929 cells correlate with virulence. *Infect. Immun.*, 64(6):1968–1976, Jun 1996.
- E. Fernandez-Moreira, J. H. Helbig, and M. S. Swanson. Membrane vesicles shed by *Legionella pneumophila* inhibit fusion of phagosomes with lysosomes. *Infect. Immun.*, 74(6):3285–3295, Jun 2006.
- B. S. Fields, R. F. Benson, and R. E. Besser. *Legionella* and Legionnaires’ disease: 25 years of investigation. *Clin. Microbiol. Rev.*, 15(3):506–526, Jul 2002.
- M. F. Fontana and R. E. Vance. Two signal models in innate immunity. *Immunol. Rev.*, 243(1):26–39, Sep 2011.
- M. F. Fontana, S. Banga, K. C. Barry, X. Shen, Y. Tan, Z. Q. Luo, and R. E. Vance. Secreted bacterial effectors that inhibit host protein synthesis are critical for induction of the innate immune response to virulent *Legionella pneumophila*. *PLoS Pathog.*, 7(2):e1001289, Feb 2011.
- A. Fortier, K. Doiron, M. Saleh, S. Grinstein, and P. Gros. Restriction of *Legionella pneumophila* replication in macrophages requires concerted action of the transcriptional regulators Irf1 and Irf8 and nod-like receptors Naip5 and Nlrc4. *Infect. Immun.*, 77(11):4794–4805, Nov 2009.
- D. W. Fraser, T. R. Tsai, W. Orenstein, W. E. Parkin, H. J. Beecham, R. G. Sharrar, J. Harris, G. F. Mallison, S. M. Martin, J. E. McDade, C. C. Shepard, and P. S. Brachman. Legionnaires’ disease: description of an epidemic of pneumonia. *N. Engl. J. Med.*, 297(22):1189–1197, Dec 1977.
- M. S. Frutuoso, J. I. Hori, M. S. Pereira, D. S. Junior, F. Sonogo, K. S. Kobayashi, R. A. Flavell, F. Q. Cunha, and D. S. Zamboni. The pattern recognition receptors Nod1 and Nod2 account for neutrophil recruitment to the lungs of mice infected with *Legionella pneumophila*. *Microbes Infect.*, 12(11): 819–827, Oct 2010.

7 Literaturverzeichnis

- O. Gal-Mor and G. Segal. The *Legionella pneumophila* GacA homolog (LetA) is involved in the regulation of *icm* virulence genes and is required for intracellular multiplication in *Acanthamoeba castellanii*. *Microb. Pathog.*, 34(4):187–194, Apr 2003a.
- O. Gal-Mor and G. Segal. Identification of CpxR as a positive regulator of *icm* and *dot* virulence genes of *Legionella pneumophila*. *J. Bacteriol.*, 185(16):4908–4919, Aug 2003b.
- F. Galka, S. N. Wai, H. Kusch, S. Engelmann, M. Hecker, B. Schmeck, S. Hippenstiel, B. E. Uhlin, and M. Steinert. Proteomic characterization of the whole secretome of *Legionella pneumophila* and functional analysis of outer membrane vesicles. *Infect. Immun.*, 76(5):1825–1836, May 2008.
- L. Y. Gao and Y. Abu Kwaik. Activation of caspase 3 during *Legionella pneumophila*-induced apoptosis. *Infect. Immun.*, 67(9):4886–4894, Sep 1999a.
- L. Y. Gao and Y. Abu Kwaik. Apoptosis in macrophages and alveolar epithelial cells during early stages of infection by *Legionella pneumophila* and its role in cytopathogenicity. *Infect. Immun.*, 67(2):862–870, Feb 1999b.
- L. Y. Gao and Y. A. Kwaik. The mechanism of killing and exiting the protozoan host *Acanthamoeba polyphaga* by *Legionella pneumophila*. *Environ. Microbiol.*, 2(1):79–90, Feb 2000.
- X. Gao, J. Wang, D. Q. Yu, F. Bian, B. B. Xie, X. L. Chen, B. C. Zhou, L. H. Lai, Z. X. Wang, J. W. Wu, and Y. Z. Zhang. Structural basis for the autoprocessing of zinc metalloproteases in the thermolysin family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 107(41):17569–17574, Oct 2010.
- R. A. Garduño, E. Garduño, and P. S. Hoffman. Surface-associated Hsp60 chaperonin of *Legionella pneumophila* mediates invasion in a HeLa cell model. *Infect. Immun.*, 66(10):4602–4610, Oct 1998.
- R. A. Garduño, A. Chong, G. K. Nasrallah, and D. S. Allan. The *Legionella pneumophila* Chaperonin - An Unusual Multifunctional Protein in Unusual Locations. *Front Microbiol.*, 2:122, 2011.
- R. T. Gazzinelli and E. Y. Denkers. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nat. Rev. Immunol.*, 6(12):895–906, Dec 2006.
- R. E. Gerszten, E. A. Garcia-Zepeda, Y. C. Lim, M. Yoshida, H. A. Ding, M. A. Gimbrone, A. D. Luster, F. W. Luscinskas, and A. Rosenzweig. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature*, 398(6729):718–723, Apr 1999.
- A. T. Gewirtz, T. A. Navas, S. Lyons, P. J. Godowski, and J. L. Madara. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J. Immunol.*, 167(4):1882–1885, Aug 2001.
- J. Gil and A. Martinez-Hernandez. The connective tissue of the rat lung: electron immunohistochemical studies. *J. Histochem. Cytochem.*, 32(2):230–238, Feb 1984.

- R. Girard, T. Pedron, S. Uematsu, V. Balloy, M. Chignard, S. Akira, and R. Chaby. Lipopolysaccharides from *Legionella* and *Rhizobium* stimulate mouse bone marrow granulocytes via Toll-like receptor 2. *J. Cell. Sci.*, 116(Pt 2):293–302, Jan 2003.
- T. H. Glick, M. B. Gregg, B. Berman, G. Mallison, W. W. Rhodes, and I. Kassanoff. Pontiac fever. An epidemic of unknown etiology in a health department: I. Clinical and epidemiologic aspects. *Am. J. Epidemiol.*, 107(2):149–160, Feb 1978.
- T. Gonzales and J. Robert-Baudouy. Bacterial aminopeptidases: properties and functions. *FEMS Microbiol. Rev.*, 18(4):319–344, Jul 1996.
- E. R. Green and J. Meccas. Bacterial Secretion Systems: An Overview. *Microbiol Spectr*, 4(1), Feb 2016.
- S. Gronow and H. Brade. Lipopolysaccharide biosynthesis: which steps do bacteria need to survive? *J. Endotoxin Res.*, 7(1):3–23, 2001.
- S. B. Guttenplan and D. B. Kearns. Regulation of flagellar motility during biofilm formation. *FEMS Microbiol. Rev.*, 37(6):849–871, Nov 2013.
- L. M. Hales and H. A. Shuman. *Legionella pneumophila* contains a type II general secretion pathway required for growth in amoebae as well as for secretion of the Msp protease. *Infect. Immun.*, 67(7):3662–3666, Jul 1999a.
- L. M. Hales and H. A. Shuman. The *Legionella pneumophila rpoS* gene is required for growth within *Acanthamoeba castellanii*. *J. Bacteriol.*, 181(16):4879–4889, Aug 1999b.
- B. K. Hammer and M. S. Swanson. Co-ordination of *Legionella pneumophila* virulence with entry into stationary phase by ppGpp. *Mol. Microbiol.*, 33(4):721–731, Aug 1999.
- B. K. Hammer, E. S. Tateda, and M. S. Swanson. A two-component regulator induces the transmission phenotype of stationary-phase *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbiol.*, 44(1):107–118, Apr 2002.
- O. S. Harb, L. Y. Gao, and Y. Abu Kwaik. From protozoa to mammalian cells: a new paradigm in the life cycle of intracellular bacterial pathogens. *Environ. Microbiol.*, 2(3):251–265, Jun 2000.
- C. R. Harding, G. N. Schroeder, J. W. Collins, and G. Frankel. Use of *Galleria mellonella* as a model organism to study *Legionella pneumophila* infection. *J Vis Exp*, 1(81):e50964, Nov 2013.
- D. L. Hava and A. Camilli. Large-scale identification of serotype 4 *Streptococcus pneumoniae* virulence factors. *Mol. Microbiol.*, 45(5):1389–1406, Sep 2002.
- T. R. Hawn, A. Verbon, K. D. Lettinga, L. P. Zhao, S. S. Li, R. J. Laws, S. J. Skerrett, B. Beutler, L. Schroeder, A. Nachman, A. Ozinsky, K. D. Smith, and A. Aderem. A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires’ disease. *J. Exp. Med.*, 198(10):1563–1572, Nov 2003.

7 Literaturverzeichnis

- T. R. Hawn, K. D. Smith, A. Aderem, and S. J. Skerrett. Myeloid differentiation primary response gene (88)- and toll-like receptor 2-deficient mice are susceptible to infection with aerosolized *Legionella pneumophila*. *J. Infect. Dis.*, 193(12):1693–1702, Jun 2006.
- T. R. Hawn, W. R. Berrington, I. A. Smith, S. Uematsu, S. Akira, A. Aderem, K. D. Smith, and S. J. Skerrett. Altered inflammatory responses in TLR5-deficient mice infected with *Legionella pneumophila*. *J. Immunol.*, 179(10):6981–6987, Nov 2007.
- J. He, F. Huang, H. Chen, Q. Chen, J. Zhang, J. Li, D. Chen, and J. Chen. Recombinant Mip-PilE-FlaA dominant epitopes vaccine candidate against *Legionella pneumophila*. *Immunol. Lett.*, 186:33–40, Jun 2017.
- L. W. Heck, K. Morihara, W. B. McRae, and E. J. Miller. Specific cleavage of human type III and IV collagens by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *Infect. Immun.*, 51(1):115–118, Jan 1986.
- W. Hell, A. Essig, S. Bohnet, S. Gattermann, and R. Marre. Cleavage of tumor necrosis factor- α by *Legionella* exoprotease. *APMIS*, 101(2):120–126, Feb 1993.
- L. B. Hersh and K. Morihara. Comparison of the subsite specificity of the mammalian neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) to the bacterial neutral endopeptidase thermolysin. *J. Biol. Chem.*, 261(14):6433–6437, May 1986.
- K. Heuner and C. Albert-Weissenberger. The flagellar regulon of *Legionella pneumophila* and the expression of virulence traits. *Legionella: Molecular Microbiology*, K. Heuner and M. Swanson (Eds.), Norfolk, UK: Caister Academic Press, pages 101–121, Mar 2008.
- K. Heuner and M. Steinert. The flagellum of *Legionella pneumophila* and its link to the expression of the virulent phenotype. *Int. J. Med. Microbiol.*, 293(2-3):133–143, Jun 2003.
- K. Heuner, L. Bender-Beck, B. C. Brand, P. C. Lück, K. H. Mann, R. Marre, M. Ott, and J. Hacker. Cloning and genetic characterization of the flagellum subunit gene (*flaA*) of *Legionella pneumophila* serogroup 1. *Infect. Immun.*, 63(7):2499–2507, Jul 1995.
- K. Heuner, J. Hacker, and B. C. Brand. The alternative sigma factor σ^{28} of *Legionella pneumophila* restores flagellation and motility to an *Escherichia coli* *flhA* mutant. *J. Bacteriol.*, 179(1):17–23, Jan 1997.
- K. Heuner, B. C. Brand, and J. Hacker. The expression of the flagellum of *Legionella pneumophila* is modulated by different environmental factors. *FEMS Microbiol. Lett.*, 175(1):69–77, Jun 1999.
- K. Heuner, C. Dietrich, M. Steinert, U. B. Gobel, and J. Hacker. Cloning and characterization of a *Legionella pneumophila*-specific gene encoding a member of the LysR family of transcriptional regulators. *Mol. Gen. Genet.*, 264(1-2):204–211, Sep 2000.

- K. Heuner, C. Dietrich, C. Skriwan, M. Steinert, and J. Hacker. Influence of the alternative σ^{28} factor on virulence and flagellum expression of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.*, 70(3):1604–1608, Mar 2002.
- Klaus Heuner, Sebastian Jacobi, Christiane Albert, Michael Steinert, Holger Brüggemann, and Carmen Buchrieser. Gene expression and virulence in *Legionella*: the flagellar regulon. In *Legionella*, pages 327–332. American Society of Microbiology, 2006.
- S. Hägele, R. Köhler, H. Merkert, M. Schleicher, J. Hacker, and M. Steinert. *Dictyostelium discoideum*: a new host model system for intracellular pathogens of the genus *Legionella*. *Cell. Microbiol.*, 2(2): 165–171, Apr 2000.
- P. S. Hiemstra. Novel roles of protease inhibitors in infection and inflammation. *Biochem. Soc. Trans.*, 30(2):116–120, Apr 2002.
- H. Hilbi, G. Segal, and H. A. Shuman. Icm/dot-dependent upregulation of phagocytosis by *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbiol.*, 42(3):603–617, Nov 2001.
- R. Hoge, A. Pelzer, F. Rosenau, and S. Wilhelm. Weapons of a pathogen: Proteases and their role in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, A. Méndez-Vilas (Ed.), 1:383–395, Jan 2010.
- I. A. Holder. The pathogenesis of infections owing to *Pseudomonas aeruginosa* using the burned mouse model: experimental studies from the Shriners Burns Institute, Cincinnati. *Can. J. Microbiol.*, 31(4): 393–402, Apr 1985.
- I. A. Holder and R. Wheeler. Experimental studies of the pathogenesis of infections owing to *Pseudomonas aeruginosa*: elastase, an IgG protease. *Can. J. Microbiol.*, 30(9):1118–1124, Sep 1984.
- A. N. Honko and S. B. Mizel. Effects of flagellin on innate and adaptive immunity. *Immunol. Res.*, 33(1):83–101, 2005.
- N. M. Hooper. Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett.*, 354(1):1–6, Oct 1994.
- J. Hoppe. *Charakterisierung des Virulenzfaktors PilY1 aus Legionella pneumophila*. Dissertation, Technische Universität Braunschweig, Institut für Mikrobiologie, 2017.
- J. Hoppe, C. M. Unal, S. Thiem, L. Grimpe, T. Goldmann, N. Gassler, M. Richter, O. Shevchuk, and M. Steinert. PilY1 Promotes *Legionella pneumophila* Infection of Human Lung Tissue Explants and Contributes to Bacterial Adhesion, Host Cell Invasion, and Twitching Motility. *Front Cell Infect Microbiol.*, 7:63, 2017.
- M. A. Horwitz. Formation of a novel phagosome by the Legionnaires’ disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocytes. *J. Exp. Med.*, 158(4):1319–1331, Oct 1983.

7 Literaturverzeichnis

- M. A. Horwitz. Phagocytosis of the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) occurs by a novel mechanism: engulfment within a pseudopod coil. *Cell*, 36(1):27–33, Jan 1984.
- G. Hovel-Miner, S. Pampou, S. P. Faucher, M. Clarke, I. Morozova, P. Morozov, J. J. Russo, H. A. Shuman, and S. Kalachikov. σ S controls multiple pathways associated with intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. *J. Bacteriol.*, 191(8):2461–2473, Apr 2009.
- A. Hubber and C. R. Roy. Modulation of host cell function by *Legionella pneumophila* type IV effectors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 26:261–283, 2010.
- L. K. Husmann and W. Johnson. Adherence of *Legionella pneumophila* to guinea pig peritoneal macrophages, J774 mouse macrophages, and undifferentiated U937 human monocytes: role of Fc and complement receptors. *Infect. Immun.*, 60(12):5212–5218, Dec 1992.
- W. M. Huston, J. Naylor, N. P. Cianciotto, M. P. Jennings, and A. G. McEwan. Functional analysis of the multi-copper oxidase from *Legionella pneumophila*. *Microbes Infect.*, 10(5):497–503, Apr 2008.
- R. O. Hynes. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science*, 326(5957):1216–1219, Nov 2009.
- K. Inouye, M. Minoda, T. Takita, H. Sakurama, Y. Hashida, M. Kusano, and K. Yasukawa. Extracellular production of recombinant thermolysin expressed in *Escherichia coli*, and its purification and enzymatic characterization. *Protein Expr. Purif.*, 46(2):248–255, Apr 2006.
- K. Inouye, M. Kusano, Y. Hashida, M. Minoda, and K. Yasukawa. Engineering, expression, purification, and production of recombinant thermolysin. *Biotechnol Annu Rev*, 13:43–64, 2007.
- T. Iwase, A. Tajima, S. Sugimoto, K. Okuda, I. Hironaka, Y. Kamata, K. Takada, and Y. Mizunoe. A simple assay for measuring catalase activity: a visual approach. *Sci Rep*, 3:3081, 2013.
- S. Jacobi and K. Heuner. Description of a putative type I secretion system in *Legionella pneumophila*. *Int. J. Med. Microbiol.*, 293(5):349–358, Nov 2003.
- S. Jacobi, R. Schade, and K. Heuner. Characterization of the alternative sigma factor σ^{54} and the transcriptional regulator FleQ of *Legionella pneumophila*, which are both involved in the regulation cascade of flagellar gene expression. *J. Bacteriol.*, 186(9):2540–2547, May 2004.
- B. W. James, W. S. Mauchline, R. B. Fitzgeorge, P. J. Dennis, and C. W. Keevil. Influence of iron-limited continuous culture on physiology and virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.*, 63(11):4224–4230, Nov 1995.
- C. A. Janeway and R. Medzhitov. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.*, 20:197–216, 2002.
- U. Jankiewicz and W. Bielawski. The properties and functions of bacterial aminopeptidases. *Acta Microbiol. Pol.*, 52(3):217–231, 2003.
- K. F. Jarrell and M. J. McBride. The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nat. Rev. Microbiol.*, 6(6):466–476, Jun 2008.

- S. E. Jensen, I. T. Fecycz, and J. N. Campbell. Nutritional factors controlling exocellular protease production by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 144(2):844–847, Nov 1980.
- R. I. Jepras, R. B. Fitzgeorge, and A. Baskerville. A comparison of virulence of two strains of *Legionella pneumophila* based on experimental aerosol infection of guinea-pigs. *J Hyg (Lond)*, 95(1):29–38, Aug 1985.
- J. Jäger, S. Marwitz, J. Tiefenau, J. Rasch, O. Shevchuk, C. Kugler, T. Goldmann, and M. Steinert. Human lung tissue explants reveal novel interactions during *Legionella pneumophila* infections. *Infect. Immun.*, 82(1):275–285, Jan 2014.
- J. Jäger, S. Keese, M. Roessle, M. Steinert, and A. B. Schromm. Fusion of *Legionella pneumophila* outer membrane vesicles with eukaryotic membrane systems is a mechanism to deliver pathogen factors to host cell membranes. *Cell. Microbiol.*, 17(5):607–620, May 2015.
- F. Jin, O. Matsushita, S. Katayama, S. Jin, C. Matsushita, J. Minami, and A. Okabe. Purification, characterization, and primary structure of *Clostridium perfringens* lambda-toxin, a thermolysin-like metalloprotease. *Infect. Immun.*, 64(1):230–237, Jan 1996.
- C. W. Johnston, J. Plumb, X. Li, S. Grinstein, and N. A. Magarvey. Informatic analysis reveals *Legionella* as a source of novel natural products. *Synth Syst Biotechnol*, 1(2):130–136, Jun 2016.
- P. Jolicoeur and J. Pontier. Population growth and decline: a four-parameter generalization of the logistic curve. *J. theor. Biol.*, 141(4):563–571, Dec 1989.
- I. Jorgensen, M. M. Bednar, V. Amin, B. K. Davis, J. P. Ting, D. G. McCafferty, and R. H. Valdivia. The *Chlamydia* protease CPAF regulates host and bacterial proteins to maintain pathogen vacuole integrity and promote virulence. *Cell Host Microbe*, 10(1):21–32, Jul 2011.
- H. C. Jung, L. Eckmann, S. K. Yang, A. Panja, J. Fierer, E. Morzycka-Wroblewska, and M. F. Kagnoff. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J. Clin. Invest.*, 95(1):55–65, Jan 1995.
- R. Kamata, K. Matsumoto, R. Okamura, T. Yamamoto, and H. Maeda. The serratial 56K protease as a major pathogenic factor in serratial keratitis. Clinical and experimental study. *Ophthalmology*, 92(10):1452–1459, Oct 1985.
- H. Kato, O. Takeuchi, S. Sato, M. Yoneyama, M. Yamamoto, K. Matsui, S. Uematsu, A. Jung, T. Kawai, K. J. Ishii, O. Yamaguchi, K. Otsu, T. Tsujimura, C. S. Koh, C. Reis e Sousa, Y. Matsuura, T. Fujita, and S. Akira. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*, 441(7089):101–105, May 2006.
- C. Katz and E. Z. Ron. Dual role of FtsH in regulating lipopolysaccharide biosynthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 190(21):7117–7122, Nov 2008.

7 Literaturverzeichnis

- S. M. Katz, S. Hashemi, K. R. Brown, W. A. Habib, and J. M. Hammel. Pleomorphism of *Legionella pneumophila*. *Ultrastruct Pathol*, 6(2-3):117–129, 1984.
- A. Kawamoto, Y. V. Morimoto, T. Miyata, T. Minamino, K. T. Hughes, T. Kato, and K. Namba. Common and distinct structural features of *Salmonella* injectisome and flagellar basal body. *Sci Rep*, 3:3369, Nov 2013.
- M. G. Keen and P. S. Hoffman. Characterization of a *Legionella pneumophila* extracellular protease exhibiting hemolytic and cytotoxic activities. *Infect. Immun.*, 57(3):732–738, Mar 1989.
- T. E. Kehl-Fie and E. P. Skaar. Nutritional immunity beyond iron: a role for manganese and zinc. *Curr Opin Chem Biol*, 14(2):218–224, Apr 2010.
- E. Kessler, M. Safrin, J. K. Gustin, and D. E. Ohman. Elastase and the LasA protease of *Pseudomonas aeruginosa* are secreted with their propeptides. *J. Biol. Chem.*, 273(46):30225–30231, Nov 1998.
- A. Kharazmi, N. Høiby, G. Döring, and N. H. Valerius. *Pseudomonas aeruginosa* exoproteases inhibit human neutrophil chemiluminescence. *Infect. Immun.*, 44(3):587–591, Jun 1984.
- C. M. Kim, R. Y. Park, H. J. Chun, S. Y. Kim, J. H. Rhee, and S. H. Shin. *Vibrio vulnificus* metalloprotease VvpE is essentially required for swarming. *FEMS Microbiol. Lett.*, 269(1):170–179, Apr 2007.
- S. K. Kim, J. Y. Yang, and J. Cha. Cloning and sequence analysis of a novel metalloprotease gene from *Vibrio parahaemolyticus* 04. *Gene*, 283(1-2):277–286, Jan 2002.
- J. Klose, N. Wendt, S. Kubald, E. Krause, K. Fechner, M. Beyermann, M. Bienert, R. Rudolph, and S. Rothmund. Hexa-histidin tag position influences disulfide structure but not binding behavior of in vitro folded N-terminal domain of rat corticotropin-releasing factor receptor type 2a. *Protein Sci.*, 13(9):2470–2475, Sep 2004.
- Y. Komori, T. Nonogaki, and T. Nikai. Hemorrhagic activity and muscle damaging effect of *Pseudomonas aeruginosa* metalloproteinase (elastase). *Toxicon*, 39(9):1327–1332, Sep 2001.
- T. Komura, C. Yasui, H. Miyamoto, and Y. Nishikawa. *Caenorhabditis elegans* as an alternative model host for *Legionella pneumophila*, and protective effects of *Bifidobacterium infantis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76(12):4105–4108, Jun 2010.
- E. V. Koonin and L. Aravind. The NACHT family - a new group of predicted NTPases implicated in apoptosis and MHC transcription activation. *Trends Biochem. Sci.*, 25(5):223–224, May 2000.
- J. Koziel and J. Potempa. Protease-armed bacteria in the skin. *Cell Tissue Res.*, 351(2):325–337, Feb 2013.
- A. S. Krause, M. R. Weihrauch, U. Bode, G. Fleischhack, T. Elter, T. Heuer, A. Engert, V. Diehl, and A. Josting. Carboxypeptidase-G2 rescue in cancer patients with delayed methotrexate elimination after high-dose methotrexate therapy. *Leuk. Lymphoma*, 43(11):2139–2143, Nov 2002.

- C. Krinos, A. S. High, and F. G. Rodgers. Role of the 25 kDa major outer membrane protein of *Legionella pneumophila* in attachment to U-937 cells and its potential as a virulence factor for chick embryos. *J. Appl. Microbiol.*, 86(2):237–244, Feb 1999.
- T. Kubori, M. Okumura, N. Kobayashi, D. Nakamura, M. Iwakura, and S. I. Aizawa. Purification and characterization of the flagellar hook-basal body complex of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*, 24(2):399–410, Apr 1997.
- S. Kumar, D. Atray, D. Paiwal, G. Balasubramanyam, P. Duraiswamy, and S. Kulkarni. Dental unit waterlines: source of contamination and cross-infection. *J. Hosp. Infect.*, 74(2):99–111, Feb 2010.
- E. R. Kunji, I. Mierau, A. Hagting, B. Poolman, and W. N. Konings. The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70(2-4):187–221, Oct 1996.
- Y. A. Kwai. Invasion of mammalian and protozoan cells by *Legionella pneumophila*. *Subcell. Biochem.*, 33:383–410, 2000.
- D. B. Lacy, W. Tepp, A. C. Cohen, B. R. DasGupta, and R. C. Stevens. Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity. *Nat. Struct. Biol.*, 5(10):898–902, Oct 1998.
- U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680–685, Aug 1970.
- M. A. Lambert and C. W. Moss. Cellular fatty acid compositions and isoprenoid quinone contents of 23 *Legionella* species. *J. Clin. Microbiol.*, 27(3):465–473, Mar 1989.
- C. Lang, E. Rastew, B. Hermes, E. Siegbrecht, R. Ahrends, S. Banerji, and A. Flieger. Zinc metalloproteinase ProA directly activates *Legionella pneumophila* PlaC glycerophospholipid:cholesterol acyltransferase. *J. Biol. Chem.*, 287(28):23464–23478, Jul 2012.
- C. Lang, M. Hiller, and A. Flieger. Disulfide loop cleavage of *Legionella pneumophila* PlaA boosts lysophospholipase A activity. *Sci Rep*, 7(1):16313, Nov 2017.
- R. Lau, S. Maqsood, D. Harte, B. Caughley, and R. Deacon. Prevalence of *Legionella* strains in cooling towers and legionellosis cases in New Zealand. *J Environ Health*, 75(6):82–89, 2013.
- C. Lück and J. H. Helbig. Characterization of *Legionella* lipopolysaccharide. *Methods Mol. Biol.*, 954:381–390, 2013.
- H. Le Moual, A. Devault, B. P. Roques, P. Crine, and G. Boileau. Identification of glutamic acid 646 as a zinc-coordinating residue in endopeptidase-24.11. *J. Biol. Chem.*, 266(24):15670–15674, Aug 1991.
- H. Le Moual, B. P. Roques, P. Crine, and G. Boileau. Substitution of potential metal-coordinating amino acid residues in the zinc-binding site of endopeptidase-24.11. *FEBS Lett.*, 324(2):196–200, Jun 1993.

7 Literaturverzeichnis

- H. Le Moual, N. Dion, B. P. Roques, P. Crine, and G. Boileau. Asp650 is crucial for catalytic activity of neutral endopeptidase 24-11. *Eur. J. Biochem.*, 221(1):475–480, Apr 1994.
- K. P. Lemon, D. E. Higgins, and R. Kolter. Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *J. Bacteriol.*, 189(12):4418–4424, Jun 2007.
- R. Lesnik, I. Brettar, and M. G. Hofle. *Legionella* species diversity and dynamics from surface reservoir to tap water: from cold adaptation to thermophily. *ISME J*, 10(5):1064–1080, May 2016.
- S. Letoffe, P. Delepelaire, and C. Wandersman. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Serratia marcescens* metalloprotease gene: secretion of the protease from *E. coli* in the presence of the *Erwinia chrysanthemi* protease secretion functions. *J. Bacteriol.*, 173(7):2160–2166, Apr 1991.
- H. Li, T. Tanikawa, Y. Sato, Y. Nakagawa, and T. Matsuyama. *Serratia marcescens* gene required for surfactant serrawettin W1 production encodes putative aminolipid synthetase belonging to nonribosomal peptide synthetase family. *Microbiol. Immunol.*, 49(4):303–310, 2005.
- L. Li, N. Mendis, H. Trigui, and S. P. Faucher. Transcriptomic changes of *Legionella pneumophila* in water. *BMC Genomics*, 16:637, Aug 2015.
- Z. Li, A. S. Dugan, G. Bloomfield, J. Skelton, A. Ivens, V. Losick, and R. R. Isberg. The amoebal MAP kinase response to *Legionella pneumophila* is regulated by DupA. *Cell Host Microbe*, 6(3):253–267, Sep 2009.
- K. L. Lightfield, J. Persson, S. W. Brubaker, C. E. Witte, J. von Moltke, E. A. Dunipace, T. Henry, Y. H. Sun, D. Cado, W. F. Dietrich, D. M. Monack, R. M. Tsolis, and R. E. Vance. Critical function for Naip5 in inflammasome activation by a conserved carboxy-terminal domain of flagellin. *Nat. Immunol.*, 9(10):1171–1178, Oct 2008.
- K. L. Lightfield, J. Persson, N. J. Trinidad, S. W. Brubaker, E. M. Kofoed, J. D. Sauer, E. A. Dunipace, S. E. Warren, E. A. Miao, and R. E. Vance. Differential requirements for NAIP5 in activation of the NLRP4 inflammasome. *Infect. Immun.*, 79(4):1606–1614, Apr 2011.
- M. R. Liles, P. H. Edelstein, and N. P. Cianciotto. The prepilin peptidase is required for protein secretion by and the virulence of the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbiol.*, 31(3):959–970, Feb 1999.
- M. R. Liles, T. A. Scheel, and N. P. Cianciotto. Discovery of a nonclassical siderophore, legiobactin, produced by strains of *Legionella pneumophila*. *J. Bacteriol.*, 182(3):749–757, Feb 2000.
- J. Lippmann, S. Rothenburg, N. Deigendesch, J. Eitel, K. Meixenberger, V. van Laak, H. Slevogt, P. D. N’guessan, S. Hippenstiel, T. Chakraborty, A. Flieger, N. Suttorp, and B. Opitz. IFN- β responses induced by intracellular bacteria or cytosolic DNA in different human cells do not require ZBP1 (DLM-1/DAI). *Cell. Microbiol.*, 10(12):2579–2588, Dec 2008.

- M. Liu, G. M. Conover, and R. R. Isberg. *Legionella pneumophila* EnhC is required for efficient replication in tumour necrosis factor alpha-stimulated macrophages. *Cell. Microbiol.*, 10(9):1906–1923, Sep 2008.
- S. L. Liu, T. Ezaki, H. Miura, K. Matsui, and E. Yabuuchi. Intact motility as a *Salmonella typhi* invasion-related factor. *Infect. Immun.*, 56(8):1967–1973, Aug 1988.
- T. Lund and P. E. Granum. The 105-kDa protein component of *Bacillus cereus* non-haemolytic enterotoxin (Nhe) is a metalloprotease with gelatinolytic and collagenolytic activity. *FEMS Microbiol. Lett.*, 178(2):355–361, Sep 1999.
- Z. Q. Luo and R. R. Isberg. Multiple substrates of the *Legionella pneumophila* Dot/Icm system identified by interbacterial protein transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101(3):841–846, Jan 2004.
- D. Lyerly, L. Gray, and A. Kreger. Characterization of rabbit corneal damage produced by *Serratia keratitis* and by a *serratia* protease. *Infect. Immun.*, 33(3):927–932, Sep 1981.
- D. M. Lyerly and A. S. Kreger. Importance of *serratia* protease in the pathogenesis of experimental *Serratia marcescens* pneumonia. *Infect. Immun.*, 40(1):113–119, Apr 1983.
- D. Lynch, N. Fieser, K. Glogler, V. Forsbach-Birk, and R. Marre. The response regulator LetA regulates the stationary-phase stress response in *Legionella pneumophila* and is required for efficient infection of *Acanthamoeba castellanii*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 219(2):241–248, Feb 2003.
- M. P. Machner and R. R. Isberg. Targeting of host Rab GTPase function by the intravacuolar pathogen *Legionella pneumophila*. *Dev. Cell*, 11(1):47–56, Jul 2006.
- R. M. Macnab. How bacteria assemble flagella. *Annu. Rev. Microbiol.*, 57:77–100, 2003.
- H. Maeda. Role of microbial proteases in pathogenesis. *Microbiol. Immunol.*, 40(10):685–699, 1996.
- A. Maisa, A. Brockmann, F. Renken, C. Lück, S. Pleischl, M. Exner, I. Daniels-Haardt, and A. Jurke. Epidemiological investigation and case-control study: a Legionnaires' disease outbreak associated with cooling towers in Warstein, Germany, August-September 2013. *Euro Surveill.*, 20(46), 2015.
- P. L. Makinen and K. K. Makinen. The *Enterococcus faecalis* extracellular metalloendopeptidase (EC 3.4.24.30; coccolysin) inactivates human endothelin at bonds involving hydrophobic amino acid residues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 200(2):981–985, Apr 1994.
- P. L. Makinen, D. B. Clewell, F. An, and K. K. Makinen. Purification and substrate specificity of a strongly hydrophobic extracellular metalloendopeptidase ("gelatinase") from *Streptococcus faecalis* (strain OG1-10). *J. Biol. Chem.*, 264(6):3325–3334, Feb 1989.
- J. Mampel, T. Spirig, S. S. Weber, J. A. Haagensen, S. Molin, and H. Hilbi. Planktonic replication is essential for biofilm formation by *Legionella pneumophila* in a complex medium under static and dynamic flow conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(4):2885–2895, Apr 2006.

7 Literaturverzeichnis

- C. Manske, U. Schell, and H. Hilbi. Metabolism of myo-Inositol by *Legionella pneumophila* Promotes Infection of Amoebae and Macrophages. *Appl. Environ. Microbiol.*, 82(16):5000–5014, Aug 2016.
- S. Mariathasan, K. Newton, D. M. Monack, D. Vucic, D. M. French, W. P. Lee, M. Roose-Girma, S. Erickson, and V. M. Dixit. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature*, 430(6996):213–218, Jul 2004.
- W. I. Mariencheck, J. F. Alcorn, S. M. Palmer, and J. R. Wright. *Pseudomonas aeruginosa* elastase degrades surfactant proteins A and D. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 28(4):528–537, Apr 2003.
- T. J. Marrie, D. Raoult, B. La Scola, R. J. Birtles, and E. de Carolis. *Legionella*-like and other amoebal pathogens as agents of community-acquired pneumonia. *Emerging Infect. Dis.*, 7(6):1026–1029, 2001.
- B. J. Marston, H. B. Lipman, and R. F. Breiman. Surveillance for Legionnaires’ disease. Risk factors for morbidity and mortality. *Arch. Intern. Med.*, 154(21):2417–2422, Nov 1994.
- B. J. Marston, J. F. Plouffe, T. M. File, B. A. Hackman, S. J. Salstrom, H. B. Lipman, M. S. Kolczak, and R. F. Breiman. Incidence of community-acquired pneumonia requiring hospitalization. Results of a population-based active surveillance Study in Ohio. The Community-Based Pneumonia Incidence Study Group. *Arch. Intern. Med.*, 157(15):1709–1718, 1997.
- J. Martin. Protein folding assisted by the GroEL/GroES chaperonin system. *Biochemistry Mosc.*, 63(4): 374–381, Apr 1998.
- A. Martinez, S. Torello, and R. Kolter. Sliding motility in mycobacteria. *J. Bacteriol.*, 181(23):7331–7338, Dec 1999.
- N. R. Matheson, J. Potempa, and J. Travis. Interaction of a novel form of *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease (aeruginolysin) with interleukin-6 and interleukin-8. *Biol. Chem.*, 387(7):911–915, Jul 2006.
- T. Matsuyama, A. Bhasin, and R. M. Harshey. Mutational analysis of flagellum-independent surface spreading of *Serratia marcescens* 274 on a low-agar medium. *J. Bacteriol.*, 177(4):987–991, Feb 1995.
- B. W. Matthews, P. M. Colman, J. N. Jansonius, K. Titani, K. A. Walsh, and H. Neurath. Structure of thermolysin. *Nature New Biol.*, 238(80):41–43, Jul 1972.
- B. W. Matthews, L. H. Weaver, and W. R. Kester. The conformation of thermolysin. *J. Biol. Chem.*, 249 (24):8030–8044, Dec 1974.
- K. McCoy-Simandle, C. R. Stewart, J. Dao, S. DebRoy, O. Rossier, P. J. Bryce, and N. P. Cianciotto. *Legionella pneumophila* type II secretion dampens the cytokine response of infected macrophages and epithelia. *Infect. Immun.*, 79(5):1984–1997, May 2011.

- J. E. McDade, C. C. Shepard, D. W. Fraser, T. R. Tsai, M. A. Redus, and W. R. Dowdle. Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N. Engl. J. Med.*, 297(22):1197–1203, Dec 1977.
- M. McIntyre, F. D. Quinn, P. I. Fields, and B. P. Berdal. Rapid identification of *Legionella pneumophila* zinc metalloprotease using chromogenic detection. *APMIS*, 99(4):316–320, Apr 1991.
- K. S. McIver, J. C. Olson, and D. E. Ohman. *Pseudomonas aeruginosa lasB1* mutants produce an elastase, substituted at active-site His-223, that is defective in activity, processing, and secretion. *J. Bacteriol.*, 175(13):4008–4015, Jul 1993.
- J. H. McKerrow. Human fibroblast collagenase contains an amino acid sequence homologous to the zinc-binding site of *Serratia protease*. *J. Biol. Chem.*, 262(13):5943, May 1987.
- A. McPherson. Crystallization of proteins from polyethylene glycol. *J. Biol. Chem.*, 251(20):6300–6303, Oct 1976.
- L. Mengue, M. Regnacq, W. Aucher, E. Portier, Y. Hechard, and A. Samba-Louaka. *Legionella pneumophila* prevents proliferation of its natural host *Acanthamoeba castellanii*. *Sci Rep*, 6:36448, Nov 2016.
- J. J. Merriam, R. Mathur, R. Maxfield-Boumil, and R. R. Isberg. Analysis of the *Legionella pneumophila flhI* gene: intracellular growth of a defined mutant defective for flagellum biosynthesis. *Infect. Immun.*, 65(6):2497–2501, Jun 1997.
- N. P. Minton, T. Atkinson, C. J. Bruton, and R. F. Sherwood. The complete nucleotide sequence of the *Pseudomonas* gene coding for carboxypeptidase G2. *Gene*, 31(1-3):31–38, Nov 1984.
- C. S. Mintz, R. D. Miller, N. S. Gutsell, and T. Malek. *Legionella pneumophila* protease inactivates interleukin-2 and cleaves CD4 on human T cells. *Infect. Immun.*, 61(8):3416–3421, Aug 1993.
- S. Miyoshi and S. Shinoda. Microbial metalloproteases and pathogenesis. *Microbes Infect.*, 2(1):91–98, Jan 2000.
- S. Miyoshi, H. Wakae, K. Tomochika, and S. Shinoda. Functional domains of a zinc metalloprotease from *Vibrio vulnificus*. *J. Bacteriol.*, 179(23):7606–7609, Dec 1997.
- A. Müller, J. Hacker, and B. C. Brand. Evidence for apoptosis of human macrophage-like HL-60 cells by *Legionella pneumophila* infection. *Infect. Immun.*, 64(12):4900–4906, Dec 1996.
- H. E. Müller. Proteolytic action of *Legionella pneumophila* on human serum proteins. *Infect. Immun.*, 27(1):51–53, Jan 1980.
- H. L. Mobley, R. Belas, V. Lockett, G. Chippendale, A. L. Trifillis, D. E. Johnson, and J. W. Warren. Construction of a flagellum-negative mutant of *Proteus mirabilis*: effect on internalization by human renal epithelial cells and virulence in a mouse model of ascending urinary tract infection. *Infect. Immun.*, 64(12):5332–5340, Dec 1996.

7 Literaturverzeichnis

- J. F. Moffat, W. J. Black, and L. S. Tompkins. Further molecular characterization of the cloned *Legionella pneumophila* zinc metalloprotease. *Infect. Immun.*, 62(2):751–753, Feb 1994a.
- J. F. Moffat, P. H. Edelstein, D. P. Regula, J. D. Cirillo, and L. S. Tompkins. Effects of an isogenic Zn-metalloprotease-deficient mutant of *Legionella pneumophila* in a guinea-pig pneumonia model. *Mol. Microbiol.*, 12(5):693–705, Jun 1994b.
- A. Mohabati Mobarez, R. Ahmadrajabi, N. Khoramabadi, and A. H. Salmanian. Protection against Legionnaire's Disease: Recombinant Flagellin A of *Legionella pneumophila* Can Induce Protective Immunity against Bacteremia in a BALB/c Murine Model. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 27(2): 110–116, 2017.
- A. Molla, K. Matsumoto, I. Oyamada, T. Katsuki, and H. Maeda. Degradation of protease inhibitors, immunoglobulins, and other serum proteins by *Serratia protease* and its toxicity to fibroblast in culture. *Infect. Immun.*, 53(3):522–529, Sep 1986.
- A. Molla, T. Akaike, and H. Maeda. Inactivation of various proteinase inhibitors and the complement system in human plasma by the 56-kilodalton proteinase from *Serratia marcescens*. *Infect. Immun.*, 57(6):1868–1871, Jun 1989.
- M. Molmeret and Y. Abu Kwaik. How does *Legionella pneumophila* exit the host cell? *Trends Microbiol.*, 10(6):258–260, Jun 2002.
- M. Molmeret, O. A. Alli, M. Radulic, M. Susa, M. Doric, and Y. A. Kwaik. The C-terminus of IcmT is essential for pore formation and for intracellular trafficking of *Legionella pneumophila* within *Acanthamoeba polyphaga*. *Mol. Microbiol.*, 43(5):1139–1150, Mar 2002a.
- M. Molmeret, O. A. Alli, S. Zink, A. Flieger, N. P. Cianciotto, and Y. A. Kwaik. *icmT* is essential for pore formation-mediated egress of *Legionella pneumophila* from mammalian and protozoan cells. *Infect. Immun.*, 70(1):69–78, Jan 2002b.
- M. Molmeret, D. M. Bitar, L. Han, and Y. A. Kwaik. Disruption of the phagosomal membrane and egress of *Legionella pneumophila* into the cytoplasm during the last stages of intracellular infection of macrophages and *Acanthamoeba polyphaga*. *Infect. Immun.*, 72(7):4040–4051, Jul 2004.
- M. Molmeret, M. Horn, M. Wagner, M. Santic, and Y. Abu Kwaik. Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(1):20–28, Jan 2005.
- A. B. Molofsky and M. S. Swanson. *Legionella pneumophila* CsrA is a pivotal repressor of transmission traits and activator of replication. *Mol. Microbiol.*, 50(2):445–461, Oct 2003.
- A. B. Molofsky and M. S. Swanson. Differentiate to thrive: lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle. *Mol. Microbiol.*, 53(1):29–40, Jul 2004.

- A. B. Molofsky, L. M. Shetron-Rama, and M. S. Swanson. Components of the *Legionella pneumophila* flagellar regulon contribute to multiple virulence traits, including lysosome avoidance and macrophage death. *Infect. Immun.*, 73(9):5720–5734, Sep 2005.
- A. B. Molofsky, B. G. Byrne, N. N. Whitfield, C. A. Madigan, E. T. Fuse, K. Tateda, and M. S. Swanson. Cytosolic recognition of flagellin by mouse macrophages restricts *Legionella pneumophila* infection. *J. Exp. Med.*, 203(4):1093–1104, Apr 2006.
- K. M. Monroe, S. M. McWhirter, and R. E. Vance. Identification of host cytosolic sensors and bacterial factors regulating the type I interferon response to *Legionella pneumophila*. *PLoS Pathog.*, 5(11):e1000665, Nov 2009.
- C. Montecucco and G. Schiavo. Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins. *Mol. Microbiol.*, 13(1):1–8, Jul 1994.
- T. C. Montie, R. C. Craven, and I. A. Holder. Flagellar preparations from *Pseudomonas aeruginosa*: isolation and characterization. *Infect. Immun.*, 35(1):281–288, Jan 1982.
- C. W. Moss, W. F. Bibb, D. E. Karr, G. O. Guerrant, and M. A. Lambert. Cellular fatty acid composition and ubiquinone content of *Legionella feeleyi* sp. nov. *J. Clin. Microbiol.*, 18(4):917–919, Oct 1983.
- R. R. Muder and V. L. Yu. Infection due to *Legionella* species other than *L. pneumophila*. *Clin. Infect. Dis.*, 35(8):990–998, Oct 2002.
- N. Mukaida. Interleukin-8: an expanding universe beyond neutrophil chemotaxis and activation. *Int. J. Hematol.*, 72(4):391–398, Dec 2000.
- N. Mukaida, A. Harada, K. Yasumoto, and K. Matsushima. Properties of pro-inflammatory cell type-specific leukocyte chemotactic cytokines, interleukin 8 (IL-8) and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF). *Microbiol. Immunol.*, 36(8):773–789, 1992.
- N. Mukaida, A. Harada, and K. Matsushima. Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 9(1):9–23, Mar 1998.
- S. Mukherjee, P. Das, and R. Sen. Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends Biotechnol.*, 24(11):509–515, Nov 2006.
- Patil A Mukherji R and Prabhune A. Role of extracellular proteases in biofilm disruption of gram positive bacteria with special emphasis on *Staphylococcus aureus* biofilms. *Enzyme Engineering*, 4 (1):–, 2015. ISSN 2329-6674. doi: 10.4172/2329-6674.1000126.
- F. P. Mul, A. E. Zuurbier, H. Janssen, J. Calafat, S. van Wetering, P. S. Hiemstra, D. Roos, and P. L. Hordijk. Sequential migration of neutrophils across monolayers of endothelial and epithelial cells. *J. Leukoc. Biol.*, 68(4):529–537, Oct 2000.

7 Literaturverzeichnis

- R. Murga, T. S. Forster, E. Brown, J. M. Pruckler, B. S. Fields, and R. M. Donlan. Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system. *Microbiology (Reading, Engl.)*, 147(Pt 11):3121–3126, Nov 2001.
- T. S. Murray and B. I. Kazmierczak. *Pseudomonas aeruginosa* exhibits sliding motility in the absence of type IV pili and flagella. *J. Bacteriol.*, 190(8):2700–2708, Apr 2008.
- H. Nagai and T. Kubori. Type IVB Secretion Systems of *Legionella* and Other Gram-Negative Bacteria. *Front Microbiol.*, 2:136, 2011.
- A. L. Neild, S. Shin, and C. R. Roy. Activated macrophages infected with *Legionella* inhibit T cells by means of MyD88-dependent production of prostaglandins. *J. Immunol.*, 175(12):8181–8190, Dec 2005.
- B. Neumeister, M. Faigle, M. Sommer, U. Zahringer, F. Stelter, R. Menzel, C. Schutt, and H. Northoff. Low endotoxic potential of *Legionella pneumophila* lipopolysaccharide due to failure of interaction with the monocyte lipopolysaccharide receptor CD14. *Infect. Immun.*, 66(9):4151–4157, Sep 1998.
- M. R. Neunuebel, Y. Chen, A. H. Gaspar, P. S. Backlund, A. Yergey, and M. P. Machner. De-AMPylation of the small GTPase Rab1 by the pathogen *Legionella pneumophila*. *Science*, 333(6041):453–456, Jul 2011.
- C. A. Newton, I. Perkins, R. H. Widen, H. Friedman, and T. W. Klein. Role of Toll-like receptor 9 in *Legionella pneumophila*-induced interleukin-12 p40 production in bone marrow-derived dendritic cells and macrophages from permissive and nonpermissive mice. *Infect. Immun.*, 75(1):146–151, Jan 2007a.
- H. J. Newton, F. M. Sansom, V. Bennett-Wood, and E. L. Hartland. Identification of *Legionella pneumophila*-specific genes by genomic subtractive hybridization with *Legionella micdadei* and identification of *lpnE*, a gene required for efficient host cell entry. *Infect. Immun.*, 74(3):1683–1691, Mar 2006.
- H. J. Newton, F. M. Sansom, J. Dao, A. D. McAlister, J. Sloan, N. P. Cianciotto, and E. L. Hartland. Sel1 repeat protein LpnE is a *Legionella pneumophila* virulence determinant that influences vacuolar trafficking. *Infect. Immun.*, 75(12):5575–5585, Dec 2007b.
- M. Nitschke, S. G. Costa, and J. Contiero. Rhamnolipid surfactants: an update on the general aspects of these remarkable biomolecules. *Biotechnol. Prog.*, 21(6):1593–1600, 2005.
- P. Novak and I. K. Dev. Degradation of a signal peptide by protease IV and oligopeptidase A. *J. Bacteriol.*, 170(11):5067–5075, Nov 1988.
- P. Novak, P. H. Ray, and I. K. Dev. Localization and purification of two enzymes from *Escherichia coli* capable of hydrolyzing a signal peptide. *J. Biol. Chem.*, 261(1):420–427, Jan 1986.

- T. Ogura, K. Inoue, T. Tatsuta, T. Suzaki, K. Karata, K. Young, L. H. Su, C. A. Fierke, J. E. Jackman, C. R. Raetz, J. Coleman, T. Tomoyasu, and H. Matsuzawa. Balanced biosynthesis of major membrane components through regulated degradation of the committed enzyme of lipid A biosynthesis by the AAA protease FtsH (HflB) in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 31(3):833–844, Feb 1999.
- J. C. Olson and D. E. Ohman. Efficient production and processing of elastase and LasA by *Pseudomonas aeruginosa* require zinc and calcium ions. *J. Bacteriol.*, 174(12):4140–4147, Jun 1992.
- L. A. O'Neill. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunol. Rev.*, 226:10–18, Dec 2008.
- K. Onoguchi, M. Yoneyama, and T. Fujita. Retinoic acid-inducible gene-I-like receptors. *J. Interferon Cytokine Res.*, 31(1):27–31, Jan 2011.
- B. Opitz, M. Vinzing, V. van Laak, B. Schmeck, G. Heine, S. Gunther, R. Preissner, H. Slevogt, P. D. N'Guessan, J. Eitel, T. Goldmann, A. Flieger, N. Suttrop, and S. Hippenstiel. *Legionella pneumophila* induces IFN- β in lung epithelial cells via IPS-1 and IRF-3, which also control bacterial replication. *J. Biol. Chem.*, 281(47):36173–36179, Nov 2006.
- J. J. Oppenheim, C. O. Zachariae, N. Mukaida, and K. Matsushima. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu. Rev. Immunol.*, 9:617–648, 1991.
- M. T. Osterholm, T. D. Chin, D. O. Osborne, H. B. Dull, A. G. Dean, D. W. Fraser, P. S. Hayes, and W. N. Hall. A 1957 outbreak of Legionnaires' disease associated with a meat packing plant. *Am. J. Epidemiol.*, 117(1):60–67, Jan 1983.
- George A. O'Toole and Roberto Kolter. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*, 30(2):295–304, 1998. ISSN 1365-2958.
- M. Ott, P. Messner, J. Heesemann, R. Marre, and J. Hacker. Temperature-dependent expression of flagella in *Legionella*. *J. Gen. Microbiol.*, 137(8):1955–1961, Aug 1991.
- K. Pancer and H. Stypulkowska-Misiurewicz. Pontiac fever–non-pneumonic legionellosis. *Przegl Epidemiol.*, 57(4):607–612, 2003.
- S. Pantano and C. Montecucco. The blockade of the neurotransmitter release apparatus by botulinum neurotoxins. *Cell. Mol. Life Sci.*, 71(5):793–811, Mar 2014.
- M. Parmely, A. Gale, M. Clabaugh, R. Horvat, and W. W. Zhou. Proteolytic inactivation of cytokines by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.*, 58(9):3009–3014, Sep 1990.
- S. A. Paschen, J. G. Christian, J. Vier, F. Schmidt, A. Walch, D. M. Ojcius, and G. Hacker. Cytotoxicity of *Chlamydia* is largely reproduced by expression of a single chlamydial protease. *J. Cell Biol.*, 182(1):117–127, Jul 2008.

7 Literaturverzeichnis

- V. Patil, A. Kumar, S. Kuruppath, and D. Nandi. Peptidase N encoded by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium modulates systemic infection in mice. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 51(2):431–442, Nov 2007.
- N. R. Payne and M. A. Horwitz. Phagocytosis of *Legionella pneumophila* is mediated by human monocyte complement receptors. *J. Exp. Med.*, 166(5):1377–1389, Nov 1987.
- B. Peracino, A. Balest, and S. Bozzaro. Phosphoinositides differentially regulate bacterial uptake and Nrap1-induced resistance to *Legionella* infection in *Dictyostelium*. *J. Cell. Sci.*, 123(Pt 23):4039–4051, Dec 2010.
- B. Peracino, S. Buracco, and S. Bozzaro. The Nrap (Slc11) proteins regulate development, resistance to pathogenic bacteria and iron homeostasis in *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell. Sci.*, 126(Pt 1):301–311, Jan 2013.
- M. S. Pereira, G. F. Morgantetti, L. M. Massis, C. V. Horta, J. I. Hori, and D. S. Zamboni. Activation of NLRC4 by flagellated bacteria triggers caspase-1-dependent and -independent responses to restrict *Legionella pneumophila* replication in macrophages and *in vivo*. *J. Immunol.*, 187(12):6447–6455, Dec 2011.
- N. Phin, F. Parry-Ford, T. Harrison, H. R. Stagg, N. Zhang, K. Kumar, O. Lortholary, A. Zumla, and I. Abubakar. Epidemiology and clinical management of Legionnaires’ disease. *Lancet Infect Dis*, 14(10):1011–1021, Oct 2014.
- Z. Piao, C. C. Sze, O. Barysheva, K. Iida, and S. Yoshida. Temperature-regulated formation of mycelial mat-like biofilms by *Legionella pneumophila*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(2):1613–1622, Feb 2006.
- A. Pichlmair, O. Schulz, C. P. Tan, T. I. Naslund, P. Liljestrom, F. Weber, and C. Reis e Sousa. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5’-phosphates. *Science*, 314(5801):997–1001, Nov 2006.
- L. Pine, P. S. Hoffman, G. B. Malcolm, R. F. Benson, and M. G. Keen. Determination of catalase, peroxidase, and superoxide dismutase within the genus *Legionella*. *J. Clin. Microbiol.*, 20(3):421–429, Sep 1984.
- A. H. Polesky, J. T. Ross, S. Falkow, and L. S. Tompkins. Identification of *Legionella pneumophila* genes important for infection of amoebas by signature-tagged mutagenesis. *Infect. Immun.*, 69(2):977–987, Feb 2001.
- H. Poras, S. Duquesnoy, E. Dange, A. Pinon, M. Vialette, M. C. Fournie-Zaluski, and T. Ouimet. Highly sensitive quenched fluorescent substrate of *Legionella* major secretory protein (msp) based on its structural analysis. *J. Biol. Chem.*, 287(24):20221–20230, Jun 2012.

- J. M. Pruckler, R. F. Benson, M. Moyenuddin, W. T. Martin, and B. S. Fields. Association of flagellum expression and intracellular growth of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.*, 63(12):4928–4932, Dec 1995.
- M. Pruteanu, N. P. Hyland, D. J. Clarke, B. Kiely, and F. Shanahan. Degradation of the extracellular matrix components by bacterial-derived metalloproteases: implications for inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel Dis.*, 17(5):1189–1200, May 2011.
- F. D. Quinn and L. S. Tompkins. Analysis of a cloned sequence of *Legionella pneumophila* encoding a 38 kD metalloprotease possessing haemolytic and cytotoxic activities. *Mol. Microbiol.*, 3(6):797–805, Jun 1989.
- J. Rasch. *Phänotypische Charakterisierung des Membran-assoziierten Virulenzfaktors Mip von Legionella pneumophila*. Dissertation, Technische Universität Braunschweig, Institut für Mikrobiologie, 2016.
- J. Rasch, S. Krüger, D. Fontvieille, C. M. Ünal, R. Michel, A. Labrosse, and M. Steinert. *Legionella*-protozoa-nematode interactions in aquatic biofilms and influence of Mip on *Caenorhabditis elegans* colonization. *Int. J. Med. Microbiol.*, 306(6):443–451, Sep 2016.
- N. D. Rawlings and A. J. Barrett. Introduction: Metalloproteases and their clans. *Handbook of Proteolytic Enzymes*, A. J. Barrett, N. D. Rawlings and J. F. Woessner (Eds.), 2:268–289, Oct 2012.
- N. D. Rawlings, A. J. Barrett, and R. Finn. Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.*, 44(D1):D343–350, Jan 2016.
- C. Reznitzer and J. Blom. Engulfment of the Philadelphia strain of *Legionella pneumophila* within pseudopod coils in human phagocytes. Comparison with other *Legionella* strains and species. *APMIS*, 97(2):105–114, Feb 1989.
- C. Reznitzer and A. Kharazmi. Effect of *Legionella pneumophila* cytotoxic protease on human neutrophil and monocyte function. *Microb. Pathog.*, 12(2):115–125, Feb 1992.
- C. Reznitzer, A. Williams, J. B. Wright, A. B. Dowsett, N. Milman, and R. B. Fitzgeorge. Demonstration of the intracellular production of tissue-destructive protease by *Legionella pneumophila* multiplying within guinea-pig and human alveolar macrophages. *J. Gen. Microbiol.*, 138 Pt 8:1671–1677, Aug 1992.
- C. A. Reeve, P. S. Amy, and A. Matin. Role of protein synthesis in the survival of carbon-starved *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, 160(3):1041–1046, Dec 1984.
- T. Ren, D. S. Zamboni, C. R. Roy, W. F. Dietrich, and R. E. Vance. Flagellin-deficient *Legionella* mutants evade caspase-1- and Naip5-mediated macrophage immunity. *PLoS Pathog.*, 2(3):e18, Mar 2006.

7 Literaturverzeichnis

- A. Riboldi-Tunnicliffe, B. König, S. Jessen, M. S. Weiss, J. Rahfeld, J. Hacker, G. Fischer, and R. Hilgenfeld. Crystal structure of Mip, a prolylisomerase from *Legionella pneumophila*. *Nat. Struct. Biol.*, 8(9):779–783, Sep 2001.
- G. Riviere, A. Michaud, H. R. Corradi, E. D. Sturrock, K. Ravi Acharya, V. Cogez, J. P. Bohin, D. Vieau, and P. Corvol. Characterization of the first angiotensin-converting like enzyme in bacteria: Ancestor ACE is already active. *Gene*, 399(1):81–90, Sep 2007.
- Robert Koch-Institut. Epidemiologisches bulletin 2015. Bulletin 13, Robert Koch-Institut, März 2015.
- M. Robey and N. P. Cianciotto. *Legionella pneumophila feoAB* promotes ferrous iron uptake and intracellular infection. *Infect. Immun.*, 70(10):5659–5669, Oct 2002.
- C. G. Robinson and C. R. Roy. Attachment and fusion of endoplasmic reticulum with vacuoles containing *Legionella pneumophila*. *Cell. Microbiol.*, 8(5):793–805, May 2006.
- J. Rogers, A. B. Dowsett, P. J. Dennis, J. V. Lee, and C. W. Keevil. Influence of Plumbing Materials on Biofilm Formation and Growth of *Legionella pneumophila* in Potable Water Systems. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(6):1842–1851, Jun 1994.
- B. P. Roques, F. Noble, V. Dauge, M. C. Fournie-Zaluski, and A. Beaumont. Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, 45(1):87–146, Mar 1993.
- O. Rossetto, M. Pirazzini, and C. Montecucco. *Botulinum neurotoxins*: genetic, structural and mechanistic insights. *Nat. Rev. Microbiol.*, 12(8):535–549, Aug 2014.
- O. Rossier and N. P. Cianciotto. Type II protein secretion is a subset of the PilD-dependent processes that facilitate intracellular infection by *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.*, 69(4):2092–2098, Apr 2001.
- O. Rossier and N. P. Cianciotto. The *Legionella pneumophila tatB* gene facilitates secretion of phospholipase C, growth under iron-limiting conditions, and intracellular infection. *Infect. Immun.*, 73(4):2020–2032, Apr 2005.
- O. Rossier, S. R. Starkenburg, and N. P. Cianciotto. *Legionella pneumophila* type II protein secretion promotes virulence in the A/J mouse model of Legionnaires’ disease pneumonia. *Infect. Immun.*, 72(1):310–321, Jan 2004.
- O. Rossier, J. Dao, and N. P. Cianciotto. The type II secretion system of *Legionella pneumophila* elaborates two aminopeptidases, as well as a metalloprotease that contributes to differential infection among protozoan hosts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(3):753–761, Feb 2008.
- O. Rossier, J. Dao, and N. P. Cianciotto. A type II secreted RNase of *Legionella pneumophila* facilitates optimal intracellular infection of *Hartmannella vermiformis*. *Microbiology (Reading, Engl.)*, 155(Pt 3):882–890, Mar 2009.

- T. J. Rowbotham. Current views on the relationships between amoebae, legionellae and man. *Isr. J. Med. Sci.*, 22(9):678–689, Sep 1986.
- S. Rowsell, R. A. Pauptit, A. D. Tucker, R. G. Melton, D. M. Blow, and P. Brick. Crystal structure of carboxypeptidase G2, a bacterial enzyme with applications in cancer therapy. *Structure*, 5(3): 337–347, Mar 1997.
- C. R. Roy and R. R. Isberg. Topology of *Legionella pneumophila* DotA: an inner membrane protein required for replication in macrophages. *Infect. Immun.*, 65(2):571–578, Feb 1997.
- G. Ruckdeschel and W. Ehret. *Legionella* infection. *Ergeb Inn Med Kinderheilkd*, 61:207–302, 1993.
- A. R. Russell, T. Ashfield, and R. W. Innes. *Pseudomonas syringae* Effector AvrPphB Suppresses AvrB-Induced Activation of RPM1 but Not AvrRpm1-Induced Activation. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 28(6):727–735, Jun 2015.
- N. N. Sahney, B. C. Lambe, J. T. Summersgill, and R. D. Miller. Inhibition of polymorphonuclear leukocyte function by *Legionella pneumophila* exoproducts. *Microb. Pathog.*, 9(2):117–125, Aug 1990.
- N. N. Sahney, J. T. Summersgill, J. A. Ramirez, and R. D. Miller. Inhibition of oxidative burst and chemotaxis in human phagocytes by *Legionella pneumophila* zinc metalloprotease. *J. Med. Microbiol.*, 50(6):517–525, Jun 2001.
- M. Sahoo, I. Ceballos-Olvera, L. del Barrio, and F. Re. Role of the inflammasome, IL-1, and IL-18 in bacterial infections. *ScientificWorldJournal*, 11:2037–2050, 2011.
- T. Sahr, H. Bruggemann, M. Jules, M. Lomma, C. Albert-Weissenberger, C. Cazalet, and C. Buchrieser. Two small ncRNAs jointly govern virulence and transmission in *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbiol.*, 72(3):741–762, May 2009.
- F. A. Samatey, K. Imada, S. Nagashima, F. Vonderviszt, T. Kumasaka, M. Yamamoto, and K. Namba. Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling. *Nature*, 410(6826):331–337, Mar 2001.
- F. A. Samatey, H. Matsunami, K. Imada, S. Nagashima, T. R. Shaikh, D. R. Thomas, J. Z. Chen, D. J. Derosier, A. Kitao, and K. Namba. Structure of the bacterial flagellar hook and implication for the molecular universal joint mechanism. *Nature*, 431(7012):1062–1068, Oct 2004.
- L. Scheithauer. Produktion und Charakterisierung der Zink-Metalloprotease ProA von *Legionella pneumophila*. Masterarbeit, Technische Universität Braunschweig, Institut für Mikrobiologie, 2016.
- U. Schell, S. Simon, T. Sahr, D. Hager, M. F. Albers, A. Kessler, F. Farnbauer, D. Trauner, C. Hedberg, C. Buchrieser, and H. Hilbi. The α -hydroxyketone LAI-1 regulates motility, Lqs-dependent phosphorylation signalling and gene expression of *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbiol.*, 99(4): 778–793, Feb 2016.

7 Literaturverzeichnis

- B. Schmidt, J. Rahfeld, A. Schierhorn, B. Ludwig, J. Hacker, and G. Fischer. A homodimer represents an active species of the peptidyl-prolyl cis/trans isomerase FKBP25mem from *Legionella pneumophila*. *FEBS Lett.*, 352(2):185–190, Sep 1994.
- H. Schürer. Analyse von sezernierten Proteasen von *Legionella pneumophila* und Infektionen von humanen Lungengewebsexplantaten. Bachelorarbeit, Technische Universität Braunschweig, Institut für Mikrobiologie, 2015.
- N. E. Scott, N. J. Hare, M. Y. White, J. Manos, and S. J. Cordwell. Secretome of transmissible *Pseudomonas aeruginosa* AES-1R grown in a cystic fibrosis lung-like environment. *J. Proteome Res.*, 12(12):5357–5369, Dec 2013.
- M. H. Seenivasan, V. L. Yu, and R. R. Muder. Legionnaires’ disease in long-term care facilities: overview and proposed solutions. *J Am Geriatr Soc*, 53(5):875–880, May 2005.
- R. M. Shanks, N. A. Stella, K. M. Hunt, K. M. Brothers, L. Zhang, and P. H. Thibodeau. Identification of SlpB, a Cytotoxic Protease from *Serratia marcescens*. *Infect. Immun.*, 83(7):2907–2916, Jul 2015.
- R. F. Sherwood, R. G. Melton, S. M. Alwan, and P. Hughes. Purification and properties of carboxypeptidase G2 from *Pseudomonas* sp. strain RS-16. Use of a novel triazine dye affinity method. *Eur. J. Biochem.*, 148(3):447–453, May 1985.
- R. K. Sherwood and C. R. Roy. Autophagy Evasion and Endoplasmic Reticulum Subversion: The Yin and Yang of *Legionella* Intracellular Infection. *Annu. Rev. Microbiol.*, 70:413–433, Sep 2016.
- O. Shevchuk, J. Jäger, and M. Steinert. Virulence properties of the *Legionella pneumophila* cell envelope. *Front Microbiol*, 2:74, 2011.
- L. Shi, R. Ermis, A. Garcia, D. Telgenhoff, and D. Aust. Degradation of human collagen isoforms by *Clostridium* collagenase and the effects of degradation products on cell migration. *Int Wound J*, 7(2): 87–95, Apr 2010.
- S. Shin, C. L. Case, K. A. Archer, C. V. Nogueira, K. S. Kobayashi, R. A. Flavell, C. R. Roy, and D. S. Zamboni. Type IV secretion-dependent activation of host MAP kinases induces an increased proinflammatory cytokine response to *Legionella pneumophila*. *PLoS Pathog.*, 4(11):e1000220, Nov 2008.
- H. A. Shuman, M. Purcell, G. Segal, L. Hales, and L. A. Wiater. Intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*: human pathogen or accidental tourist? *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 225: 99–112, 1998.
- T. N. Silveira and D. S. Zamboni. Pore formation triggered by *Legionella* spp. is an Nlr4 inflammasome-dependent host cell response that precedes pyroptosis. *Infect. Immun.*, 78(3):1403–1413, Mar 2010.

- B. Singh, C. Fleury, F. Jalalvand, and K. Riesbeck. Human pathogens utilize host extracellular matrix proteins laminin and collagen for adhesion and invasion of the host. *FEMS Microbiol. Rev.*, 36(6): 1122–1180, Nov 2012.
- B. J. Smith. SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. *Methods Mol. Biol.*, 1:41–55, 1984.
- M. A. Soderberg and N. P. Cianciotto. Mediators of lipid A modification, RNA degradation, and central intermediary metabolism facilitate the growth of *Legionella pneumophila* at low temperatures. *Curr. Microbiol.*, 60(1):59–65, Jan 2010.
- M. A. Soderberg, O. Rossier, and N. P. Cianciotto. The type II protein secretion system of *Legionella pneumophila* promotes growth at low temperatures. *J. Bacteriol.*, 186(12):3712–3720, Jun 2004.
- M. A. Soderberg, J. Dao, S. R. Starkenburg, and N. P. Cianciotto. Importance of type II secretion for survival of *Legionella pneumophila* in tap water and in amoebae at low temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(17):5583–5588, Sep 2008.
- J. M. Solomon and R. R. Isberg. Growth of *Legionella pneumophila* in *Dictyostelium discoideum*: a novel system for genetic analysis of host-pathogen interactions. *Trends Microbiol.*, 8(10):478–480, Oct 2000.
- J. M. Solomon, A. Rupper, J. A. Cardelli, and R. R. Isberg. Intracellular growth of *Legionella pneumophila* in *Dictyostelium discoideum*, a system for genetic analysis of host-pathogen interactions. *Infect. Immun.*, 68(5):2939–2947, May 2000.
- W. S. Song and S. I. Yoon. Crystal structure of FliC flagellin from *Pseudomonas aeruginosa* and its implication in TLR5 binding and formation of the flagellar filament. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 444(2):109–115, Feb 2014.
- T. Spirig, A. Tiaden, P. Kiefer, C. Buchrieser, J. A. Vorholt, and H. Hilbi. The *Legionella* autoinducer synthase LqsA produces an alpha-hydroxyketone signaling molecule. *J. Biol. Chem.*, 283(26): 18113–18123, Jun 2008.
- R. Sporri, N. Joller, U. Albers, H. Hilbi, and A. Oxenius. MyD88-dependent IFN-gamma production by NK cells is key for control of *Legionella pneumophila* infection. *J. Immunol.*, 176(10):6162–6171, May 2006.
- R. Sporri, N. Joller, H. Hilbi, and A. Oxenius. A novel role for neutrophils as critical activators of NK cells. *J. Immunol.*, 181(10):7121–7130, Nov 2008.
- T. W. Steele. Legionnaires’ disease in South Australia, 1979–1988. *Med. J. Aust.*, 151(6):325–326, Sep 1989.
- M. Steinert, L. Emody, R. Amann, and J. Hacker. Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(5): 2047–2053, May 1997.

7 Literaturverzeichnis

- M. Steinert, U. Hentschel, and J. Hacker. *Legionella pneumophila*: an aquatic microbe goes astray. *FEMS Microbiol. Rev.*, 26(2):149–162, Jun 2002.
- D. B. Stetson and R. Medzhitov. Type I interferons in host defense. *Immunity*, 25(3):373–381, Sep 2006.
- C. R. Stewart, O. Rossier, and N. P. Cianciotto. Surface translocation by *Legionella pneumophila*: a form of sliding motility that is dependent upon type II protein secretion. *J. Bacteriol.*, 191(5):1537–1546, Mar 2009.
- C. R. Stewart, D. M. Burnside, and N. P. Cianciotto. The surfactant of *Legionella pneumophila* Is secreted in a TolC-dependent manner and is antagonistic toward other *Legionella* species. *J. Bacteriol.*, 193(21):5971–5984, Nov 2011.
- C. R. Stewart, V. Muthye, and N. P. Cianciotto. *Legionella pneumophila* persists within biofilms formed by *Klebsiella pneumoniae*, *Flavobacterium* sp., and *Pseudomonas fluorescens* under dynamic flow conditions. *PLoS ONE*, 7(11):e50560, 2012.
- B. Stolz and H. C. Berg. Evidence for interactions between MotA and MotB, torque-generating elements of the flagellar motor of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 173(21):7033–7037, Nov 1991.
- B. J. Stone and Y. A. Kwaik. Natural competence for DNA transformation by *Legionella pneumophila* and its association with expression of type IV pili. *J. Bacteriol.*, 181(5):1395–1402, Mar 1999.
- J. E. Stout and V. L. Yu. Legionellosis. *N. Engl. J. Med.*, 337(10):682–687, Sep 1997.
- M. S. Strom and S. Lory. Structure-function and biogenesis of the type IV pili. *Annu. Rev. Microbiol.*, 47:565–596, 1993.
- H. Suzuki, K. Yonekura, and K. Namba. Structure of the rotor of the bacterial flagellar motor revealed by electron cryomicroscopy and single-particle image analysis. *J. Mol. Biol.*, 337(1):105–113, Mar 2004.
- S. Swaminathan and S. Eswaramoorthy. Crystallization and preliminary X-ray analysis of *Clostridium botulinum* neurotoxin type B. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 56(Pt 8):1024–1026, Aug 2000.
- M. S. Swanson and B. K. Hammer. *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. *Annu. Rev. Microbiol.*, 54:567–613, 2000.
- M. S. Swanson and R. R. Isberg. Association of *Legionella pneumophila* with the macrophage endoplasmic reticulum. *Infect. Immun.*, 63(9):3609–3620, Sep 1995.
- L. Szeto and H. A. Shuman. The *Legionella pneumophila* major secretory protein, a protease, is not required for intracellular growth or cell killing. *Infect. Immun.*, 58(8):2585–2592, Aug 1990.

- K. Tateda, T. A. Moore, J. C. Deng, M. W. Newstead, X. Zeng, A. Matsukawa, M. S. Swanson, K. Yamaguchi, and T. J. Standiford. Early recruitment of neutrophils determines subsequent T1/T2 host responses in a murine model of *Legionella pneumophila* pneumonia. *J. Immunol.*, 166(5):3355–3361, Mar 2001.
- H. Teruya, F. Higa, M. Akamine, C. Ishikawa, T. Okudaira, K. Tomimori, N. Mukaida, M. Tateyama, K. Heuner, J. Fujita, and N. Mori. Mechanisms of *Legionella pneumophila*-induced interleukin-8 expression in human lung epithelial cells. *BMC Microbiol.*, 7:102, Nov 2007.
- M. M. Thayer, K. M. Flaherty, and D. B. McKay. Three-dimensional structure of the elastase of *Pseudomonas aeruginosa* at 1.5-Å resolution. *J. Biol. Chem.*, 266(5):2864–2871, Feb 1991.
- D. R. Thomas, N. R. Francis, C. Xu, and D. J. DeRosier. The three-dimensional structure of the flagellar rotor from a clockwise-locked mutant of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.*, 188(20):7039–7048, Oct 2006.
- V. Thomas, T. Bouchez, V. Nicolas, S. Robert, J. F. Loret, and Y. Levi. Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in *Legionella* persistence. *J. Appl. Microbiol.*, 97(5):950–963, 2004.
- M. R. Thompson, R. D. Miller, and B. H. Iglewski. In vitro production of an extracellular protease by *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.*, 34(1):299–302, Oct 1981.
- A. Tiaden, T. Spirig, S. S. Weber, H. Bruggemann, R. Bosshard, C. Buchrieser, and H. Hilbi. The *Legionella pneumophila* response regulator LqsR promotes host cell interactions as an element of the virulence regulatory network controlled by RpoS and LetA. *Cell. Microbiol.*, 9(12):2903–2920, Dec 2007.
- A. Tiaden, T. Spirig, P. Carranza, H. Bruggemann, K. Riedel, L. Eberl, C. Buchrieser, and H. Hilbi. Synergistic contribution of the *Legionella pneumophila* *lqs* genes to pathogen-host interactions. *J. Bacteriol.*, 190(22):7532–7547, Nov 2008.
- J. P. Ting, S. B. Willingham, and D. T. Bergstralh. NLRs at the intersection of cell death and immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 8(5):372–379, May 2008.
- N. J. Tobias, T. Ahrendt, U. Schell, M. Miltenberger, H. Hilbi, and H. B. Bode. *Legionella* shows a diverse secondary metabolism dependent on a broad spectrum Sfp-type phosphopantetheinyl transferase. *PeerJ*, 4:e2720, 2016.
- P. Tossa, M. Deloge-Abarkan, D. Zmirou-Navier, P. Hartemann, and L. Mathieu. Pontiac fever: an operational definition for epidemiological studies. *BMC Public Health*, 6:112, Apr 2006.
- H. Tronel and P. Hartemann. Overview of diagnostic and detection methods for legionellosis and *Legionella* spp. *Lett. Appl. Microbiol.*, 48(6):653–656, Jun 2009.

7 Literaturverzeichnis

- D. E. Tronrud, S. L. Roderick, and B. W. Matthews. Structural basis for the action of thermolysin. *Matrix Suppl*, 1:107–111, 1992.
- H. K. Truchan, H. D. Christman, R. C. White, N. S. Rutledge, and N. P. Cianciotto. Type II Secretion Substrates of *Legionella pneumophila* Translocate Out of the Pathogen-Occupied Vacuole via a Semipermeable Membrane. *MBio*, 8(3), Jun 2017.
- P. J. Tsai, C. F. Kuo, K. Y. Lin, Y. S. Lin, H. Y. Lei, F. F. Chen, J. R. Wang, and J. J. Wu. Effect of group A streptococcal cysteine protease on invasion of epithelial cells. *Infect. Immun.*, 66(4):1460–1466, Apr 1998.
- T. F. Tsai, D. R. Finn, B. D. Plikaytis, W. McCauley, S. M. Martin, and D. W. Fraser. Legionnaires' disease: clinical features of the epidemic in Philadelphia. *Ann. Intern. Med.*, 90(4):509–517, Apr 1979.
- A. J. Turner, C. D. Brown, J. A. Carson, and K. Barnes. The neprilysin family in health and disease. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 477:229–240, 2000.
- J. Y. Tyson, M. M. Pearce, P. Vargas, S. Bagchi, B. J. Mulhern, and N. P. Cianciotto. Multiple *Legionella pneumophila* Type II secretion substrates, including a novel protein, contribute to differential infection of the amoebae *Acanthamoeba castellanii*, *Hartmannella vermiformis* and *Naegleria lovaniensis*. *Infect. Immun.*, 81(5):1399–1410, May 2013.
- R. E. Vance. Immunology taught by bacteria. *J. Clin. Immunol.*, 30(4):507–511, Jul 2010.
- R. W. Vandivier, V. A. Fadok, P. R. Hoffmann, D. L. Bratton, C. Penvari, K. K. Brown, J. D. Brain, F. J. Accurso, and P. M. Henson. Elastase-mediated phosphatidylserine receptor cleavage impairs apoptotic cell clearance in cystic fibrosis and bronchiectasis. *J. Clin. Invest.*, 109(5):661–670, Mar 2002.
- A. S. Vartanian, A. Paz, E. A. Fortgang, J. Abramson, and F. W. Dahlquist. Structure of flagellar motor proteins in complex allows for insights into motor structure and switching. *J. Biol. Chem.*, 287(43):35779–35783, Oct 2012.
- R. A. Venezia, M. D. Agresta, E. M. Hanley, K. Urquhart, and D. Schoonmaker. Nosocomial legionellosis associated with aspiration of nasogastric feedings diluted in tap water. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 15(8):529–533, Aug 1994.
- C. Venkataraman, B. J. Haack, S. Bondada, and Y. Abu Kwaik. Identification of a Gal/GalNAc lectin in the protozoan *Hartmannella vermiformis* as a potential receptor for attachment and invasion by the Legionnaires' disease bacterium. *J. Exp. Med.*, 186(4):537–547, Aug 1997.
- M. Vinzing, J. Eitel, J. Lippmann, A. C. Hocke, J. Zahlten, H. Slevogt, P. D. N'guessan, S. Gunther, B. Schmeck, S. Hippenstiel, A. Flieger, N. Suttorp, and B. Opitz. NAIP and Ipaf control *Legionella pneumophila* replication in human cells. *J. Immunol.*, 180(10):6808–6815, May 2008.

- J. P. Vogel, H. L. Andrews, S. K. Wong, and R. R. Isberg. Conjugative transfer by the virulence system of *Legionella pneumophila*. *Science*, 279(5352):873–876, Feb 1998.
- H. von Baum and C. Lück. [Community-acquired *Legionella pneumonia*: data from the CAPNETZ study]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 54(6):688–692, Jun 2011.
- H. von Baum, S. Ewig, R. Marre, N. Suttorp, S. Gonschior, T. Welte, and C. Lück. Community-acquired *Legionella pneumonia*: new insights from the German competence network for community acquired pneumonia. *Clin. Infect. Dis.*, 46(9):1356–1364, May 2008.
- C. Wagner, A. S. Khan, T. Kamphausen, B. Schmausser, C. Ünal, U. Lorenz, G. Fischer, J. Hacker, and M. Steinert. Collagen binding protein Mip enables *Legionella pneumophila* to transmigrate through a barrier of NCI-H292 lung epithelial cells and extracellular matrix. *Cell. Microbiol.*, 9(2):450–462, Feb 2007.
- M. Watarai, I. Derre, J. Kirby, J. D. Gowney, W. F. Dietrich, and R. R. Isberg. *Legionella pneumophila* is internalized by a macropinocytotic uptake pathway controlled by the Dot/Icm system and the mouse *Lgn1* locus. *J. Exp. Med.*, 194(8):1081–1096, Oct 2001.
- S. Weber, C. U. Stirnimann, M. Wieser, D. Frey, R. Meier, S. Engelhardt, X. Li, G. Capitani, R. A. Kammerer, and H. Hilbi. A type IV translocated *Legionella* cysteine phytase counteracts intracellular growth restriction by phytate. *J. Biol. Chem.*, 289(49):34175–34188, Dec 2014.
- D. Weichart, N. Querfurth, M. Dreger, and R. Hengge-Aronis. Global role for ClpP-containing proteases in stationary-phase adaptation of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 185(1):115–125, Jan 2003.
- E. D. Weinberg. Nutritional immunity. Host’s attempt to withhold iron from microbial invaders. *JAMA*, 231(1):39–41, Jan 1975.
- N. N. Whitfield, B. G. Byrne, and M. S. Swanson. Mouse macrophages are permissive to motile *Legionella* species that fail to trigger pyroptosis. *Infect. Immun.*, 78(1):423–432, Jan 2010.
- M. A. Whooley, J. A. O’Callaghan, and A. J. McLoughlin. Effect of substrate on the regulation of exoprotease production by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. *J. Gen. Microbiol.*, 129(4):981–988, Apr 1983.
- S. Wigneshweraraj, D. Bose, P. C. Burrows, N. Joly, J. Schumacher, M. Rappas, T. Pape, X. Zhang, P. Stockley, K. Severinov, and M. Buck. Modus operandi of the bacterial RNA polymerase containing the σ^{54} promoter-specificity factor. *Mol. Microbiol.*, 68(3):538–546, May 2008.
- A. Williams, A. Baskerville, A. B. Dowsett, and J. W. Conlan. Immunocytochemical demonstration of the association between *Legionella pneumophila*, its tissue-destructive protease, and pulmonary lesions in experimental legionnaires’ disease. *J. Pathol.*, 153(3):257–264, Nov 1987.

7 Literaturverzeichnis

- E. Wintermeyer, B. Ludwig, M. Steinert, B. Schmidt, G. Fischer, and J. Hacker. Influence of site specifically altered Mip proteins on intracellular survival of *Legionella pneumophila* in eukaryotic cells. *Infect. Immun.*, 63(12):4576–4583, Dec 1995.
- M. C. Wong, E. P. Ewing, C. S. Callaway, and W. L. Peacock. Intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* in cultured human embryonic lung fibroblasts. *Infect. Immun.*, 28(3):1014–1018, Jun 1980.
- E. K. Wright, S. A. Goodart, J. D. Growney, V. Hadinoto, M. G. Endrizzi, E. M. Long, K. Sadigh, A. L. Abney, I. Bernstein-Hanley, and W. F. Dietrich. Naip5 affects host susceptibility to the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*. *Curr. Biol.*, 13(1):27–36, Jan 2003.
- J. W. Wu and X. L. Chen. Extracellular metalloproteases from bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 92(2):253–262, Oct 2011.
- Z. Wu, P. Nybom, and K. E. Magnusson. Distinct effects of *Vibrio cholerae* haemagglutinin/protease on the structure and localization of the tight junction-associated proteins occludin and ZO-1. *Cell. Microbiol.*, 2(1):11–17, Feb 2000.
- J. B. Xavier, W. Kim, and K. R. Foster. A molecular mechanism that stabilizes cooperative secretions in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.*, 79(1):166–179, Jan 2011.
- Y. Yamamoto, T. W. Klein, C. A. Newton, R. Widen, and H. Friedman. Growth of *Legionella pneumophila* in thioglycolate-elicited peritoneal macrophages from A/J mice. *Infect. Immun.*, 56(2):370–375, Feb 1988.
- K. Yanagihara, K. Tomono, Y. Kaneko, Y. Miyazaki, K. Tsukamoto, Y. Hirakata, H. Mukae, J. Kadota, I. Murata, and S. Kohno. Role of elastase in a mouse model of chronic respiratory *Pseudomonas aeruginosa* infection that mimics diffuse panbronchiolitis. *J. Med. Microbiol.*, 52(Pt 6):531–535, Jun 2003.
- C. Yeats, N. D. Rawlings, and A. Bateman. The PepSY domain: a regulator of peptidase activity in the microbial environment? *Trends Biochem. Sci.*, 29(4):169–172, Apr 2004.
- E. S. Yip, D. M. Burnside, and N. P. Cianciotto. Cytochrome c4 is required for siderophore expression by *Legionella pneumophila*, whereas cytochromes c1 and c5 promote intracellular infection. *Microbiology (Reading, Engl.)*, 157(Pt 3):868–878, Mar 2011.
- K. Yonekura, S. Maki-Yonekura, and K. Namba. Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature*, 424(6949):643–650, Aug 2003.
- K. Young, L. L. Silver, D. Bramhill, P. Cameron, S. S. Eveland, C. R. Raetz, S. A. Hyland, and M. S. Anderson. The *envA* permeability/cell division gene of *Escherichia coli* encodes the second enzyme of lipid A biosynthesis. UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-N-acetylglucosamine deacetylase. *J. Biol. Chem.*, 270(51):30384–30391, Dec 1995.

- N. H. Youssef, K. E. Duncan, D. P. Nagle, K. N. Savage, R. M. Knapp, and M. J. McInerney. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *J. Microbiol. Methods*, 56(3):339–347, Mar 2004.
- V. L. Yu, J. F. Plouffe, M. C. Pastoris, J. E. Stout, M. Schousboe, A. Widmer, J. Summersgill, T. File, C. M. Heath, D. L. Paterson, and A. Cheresky. Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. *J. Infect. Dis.*, 186(1):127–128, Jul 2002.
- D. S. Zamboni, M. A. Campos, A. C. Torrecilhas, K. Kiss, J. E. Samuel, D. T. Golenbock, F. N. Lauw, C. R. Roy, I. C. Almeida, and R. T. Gazzinelli. Stimulation of toll-like receptor 2 by *Coxiella burnetii* is required for macrophage production of pro-inflammatory cytokines and resistance to infection. *J. Biol. Chem.*, 279(52):54405–54415, Dec 2004.
- D. S. Zamboni, K. S. Kobayashi, T. Kohlsdorf, Y. Ogura, E. M. Long, R. E. Vance, K. Kuida, S. Mariathasan, V. M. Dixit, R. A. Flavell, W. F. Dietrich, and C. R. Roy. The Bir1e cytosolic pattern-recognition receptor contributes to the detection and control of *Legionella pneumophila* infection. *Nat. Immunol.*, 7(3):318–325, Mar 2006.
- Z. Zhang, X. Liu, L. Chen, and J. Qiu. Chest radiographic characteristics of community-acquired *Legionella pneumonia* in the elderly. *Chin. Med. J.*, 127(12):2270–2274, 2014.
- H. Zheng, C. H. Chatfield, M. R. Liles, and N. P. Cianciotto. Secreted pyomelanin of *Legionella pneumophila* promotes bacterial iron uptake and growth under iron-limiting conditions. *Infect. Immun.*, 81(11):4182–4191, Nov 2013.
- G. Zhong. *Chlamydia trachomatis* secretion of proteases for manipulating host signaling pathways. *Front Microbiol*, 2:14, 2011.
- S. D. Zink, L. Pedersen, N. P. Cianciotto, and Y. Abu-Kwaik. The Dot/Icm type IV secretion system of *Legionella pneumophila* is essential for the induction of apoptosis in human macrophages. *Infect. Immun.*, 70(3):1657–1663, Mar 2002.
- T. Zusman, O. Gal-Mor, and G. Segal. Characterization of a *Legionella pneumophila relA* insertion mutant and roles of RelA and RpoS in virulence gene expression. *J. Bacteriol.*, 184(1):67–75, Jan 2002.
- T. Zusman, G. Aloni, E. Halperin, H. Kotzer, E. Degtyar, M. Feldman, and G. Segal. The response regulator PmrA is a major regulator of the icm/dot type IV secretion system in *Legionella pneumophila* and *Coxiella burnetii*. *Mol. Microbiol.*, 63(5):1508–1523, Mar 2007.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 8.1: Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
Å	Ångström
AAA	<i>ATPases associated with various cellular activities</i>
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
ACE	<i>Angiotensin-converting enzyme</i>
ACN	Acetonitril
ASC	<i>apoptosis-associated speck-like protein containing CARD</i>
bp	Basepaare
BCYE	<i>buffered charcoal yeast extract</i> , Legionellen-Agarmedium
BIR	<i>baculoviral inhibitory repeat-like domain</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BMDM	<i>bone marrow-derived macrophage</i>
BoNT	Botulinum-Neurotoxine
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
CARD	<i>caspase activation and recruitment domain</i>
CAPNETZ	Kompetenznetz für ambulant erworbene Pneumonien
CDC	<i>Center for Disease Control</i>
CDM	chemisch-definiertes Medium
CFU	<i>colony forming units</i> , Kolonie-bildende Einheiten
CM	Cytoplasma-Membran
Cm	Chloramphenicol
cm ²	Quadratzentimeter
CPAF	<i>chlamydial protease-like factor</i>
CP	Cytoplasma
d	Tag
DFR	<i>downstream flanking reverse</i>
DFF	<i>downstream flanking forward</i>
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure

8 Anhang

dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dot/Icm	<i>defect in organelle trafficking / intracellular multiplication</i>
ECM	<i>extracellular matrix</i> , extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
FKBPS	Familie der FK506-bindenden Proteine
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
g	Gramm
g	Erdschwerebeschleunigung (9,81 m/s ²)
GOI	<i>gene of interest</i>
GPC	Gelpermeationschromatographie
h	Stunde
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HGA	Homogentisinsäure
HLTE	<i>human lung tissue explant</i> , humanes Lungengewebeexplantat
HZI	Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung
IEF	isoelektrische Fokussierung
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IMAC	<i>immobilized metalion affinity chromatography</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
Km	Kanamycin
L	Liter
LB	„Lysogeny-Broth“, Nährmedium
LCV	<i>Legionella-containing vacuole</i>
LLAP	<i>Legionella-like amoebal pathogens</i>
LPS	Lipopolysaccharide
lqs	<i>Legionella quorum sensing</i> -Gene
LRR	<i>Leucine-rich repeats</i>
Lsp	<i>Legionella secretion pathway</i>
mA	Milliampere

Map	<i>major acid phosphatase</i> , Legionellen-Protein
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinases</i>
MAVS	<i>mitochondrial antiviral signaling protein</i>
MCAF	<i>monocyte chemotactic and activating factor</i>
mg	Milligramm
MilliQ	vollentsalztes Wasser
min	Minute
mL	Milliliter
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MOMP	<i>major outer membrane protein</i> , Legionellen-Protein
Msp	<i>major secretory protein</i> , frühere Bezeichnung von ProA
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i> , Molekulargewichtsgrenze
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanogramm
NLR	<i>NOD-like receptor</i>
NLRA	siehe NLR, A für <i>acidic transactivation domain</i>
NLRB	siehe NLR, B für BIR
NLRC	siehe NLR, C für CARD
NLRP	siehe NLR, P für Pyrin-Domäne
NOD	Nukleotid-bindende Oligomerisierungs-Domäne
OD	Optische Dichte
OMV	<i>outer membrane vesicles</i>
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	postexponentielle Wachstumsphase
PEG	Polyethylenglykol
PMN	polymorphnukleare Neutrophile
PP	Periplasma
PPF	periplasmatischen Fraktion
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PYG	<i>Peptone-yeast-glucose medium</i> , Acanthamöben-Medium
PYNFH	<i>peptone, yeast, nucleic acid, folic acid, hemin</i> , Vermamöben-Medium
RLR	<i>RIG-I-like receptor</i>

8 Anhang

RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
Rtx	<i>repeats in toxin</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEAP	<i>secreted embryonic alkaline phosphatase</i>
s(-ek)	Sekunde
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor</i>
<i>spp.</i>	<i>species pluralis</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> , thermophiles Bakterium
TB	„Terrific Broth“-Flüssigmedium
TCA	Trichloressigsäure
TED	Tris(carboxymethyl)ethylendiamin
TeNT	Tetanus-Neurotoxin
TIR	<i>Toll/ IL-1R homology domain</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
T1SS	Typ I-Sekretionssystem
T2SS	Typ II-Sekretionssystem
T4SS	Typ IV-Sekretionssystem
UFF	<i>upstream flanking forward</i>
UFR	<i>upstream flanking reverse</i>
ü.N.	über Nacht
Unb.	unbekannt
V	Volt
v/v	Volumenverhältnis
VBNC	<i>viable but not culturable</i>
WT	Wildtyp
YEB	<i>yeast extract broth</i> , Legionellen-Flüssigmedium
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter

8.2 Zusatztabeln Sekretomanalyse

Tabelle 8.2: In 2 von 3 Sekretomen der *proA*-Deletionsmutante dezimierte Proteine

GI-Nr.	Identität	Locus ¹	SigP ²	PSORT ³	Log2 ($\Delta proA$ /WT)
148281520	Hypothetical protein	LpC_1671	+	CP	-10,16
148280964	Class 4 Metalloprotease	LpC_1085	+	EC	-9,02
148281593	Glu/Leu/Phe/Val dehydrogenase	LpC_1745	-	CP	-8,42
148280758	Phospholipase C	LpC_0870	+	Unb.	-7,70
187610281	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	LpC_3053	-	CP	-7,47
148280655	L-lysine dehydrogenase	LpC_0766	-	CP	-7,28
148283082	N-acetylornithine aminotransferase ArgD	LpC_3283	-	CP	-7,19
148280175	Zinc metalloprotein	LpC_0267	+	CP	-6,80
148280004	Aspartate amino- transferase A	LpC_0093	-	CP	-6,60
148280523	Acetylornithine deacetylase	LpC_0629	-	CP	-6,49
148280373	Dienelactone hydrolase family protein	LpC_0474	-	CP	-6,48
148280893	Succinate semialdehyde dehydrogenase (NADP+)	LpC_1008	-	CP	-6,46
148282801	Single-strand binding protein (SSB)	LpC_2988	-	CP	-6,41
166918221	Chaperone protein DnaK	LpC_1509	-	CP	-6,34
166987790	Phosphoglycerate kinase	LpC_0158	-	CP	-6,20
166201715	ATP Synthase subunit β	LpC_3297	-	CP	-6,14
148283065	Cystathionine beta synthase	LpC_3266	-	CP	-6,05
148280073	Oligopeptidase A	LpC_0162	-	CP	-5,93
148283079	Peroxynitrite reductase	LpC_3280	-	CP	-5,53
148280836	2-methylcitrate dehydratase PrpD	LpC_0950	-	CP	-5,26

8 Anhang

148282525	Hypothetical protein	LpC_2701	+	Unb.	-5,16
148281161	27 kDa outer membrane protein	LpC_1286	+	PP	-4,94
166977582	Phosphoserine aminotransferase	LpC_0834	-	CP	-4,82
148280656	Piperidine-6-carboxylate dehydrogenase	LpC_0767	-	CP	-4,59
148282546	Adenosine deaminase	LpC_2723	-	CP	-4,57
148281174	Enoyl reductase	LpC_1299	-	CM	-4,57
148282202	Electron transfer flavo-protein alpha unit	LpC_2368	-	CP	-4,38
148282919	Hypothetical protein	LpC_3120	-	CP	-4,11
148281509	Ketosteroid isomerase	LpC_1660	-	Unb.	-2,67

¹ *L. pneumophila* str. Corby, GenBank: CP000675.2, Assembly: GCA_000092545.1

² SignalP 4.0: Vorhersage der Präsenz und Lokalisation von Signalpeptiden in Aminosäure-Sequenzen

³ PSORTb 3.0.2: Vorhersage der Proteinlokalisation

Tabelle 8.3: Proteine, die nur im Wildtyp-Sekretom (2 von 3) identifiziert wurden

GI-Nr.	Identität	Locus ¹	SigP ²	PSORT ³
148281225	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase	LpC_1359	+	Unb.
148281521	Conserved hypothetical protein	LpC_1672	+	Unb.
148282283	Tuloene tolerance protein Ttg2D	LpC_2451	+	Unb.
148282383	Hypothetical signal peptide protein	LpC_2556	+	Unb.

¹ *L. pneumophila* str. Corby, GenBank: CP000675.2, Assembly: GCA_000092545.1

² SignalP 4.0: Vorhersage der Präsenz und Lokalisation von Signalpeptiden in Aminosäure-Sequenzen

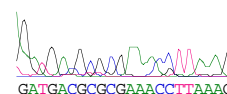
³ PSORTb 3.0.2: Vorhersage der Proteinlokalisation

8.3 Alignment der *proA*-Deletionsmutante (1/2)

Montag, 23. Juni 2014 18:10
Project: Untitled Contig 1

Page 1

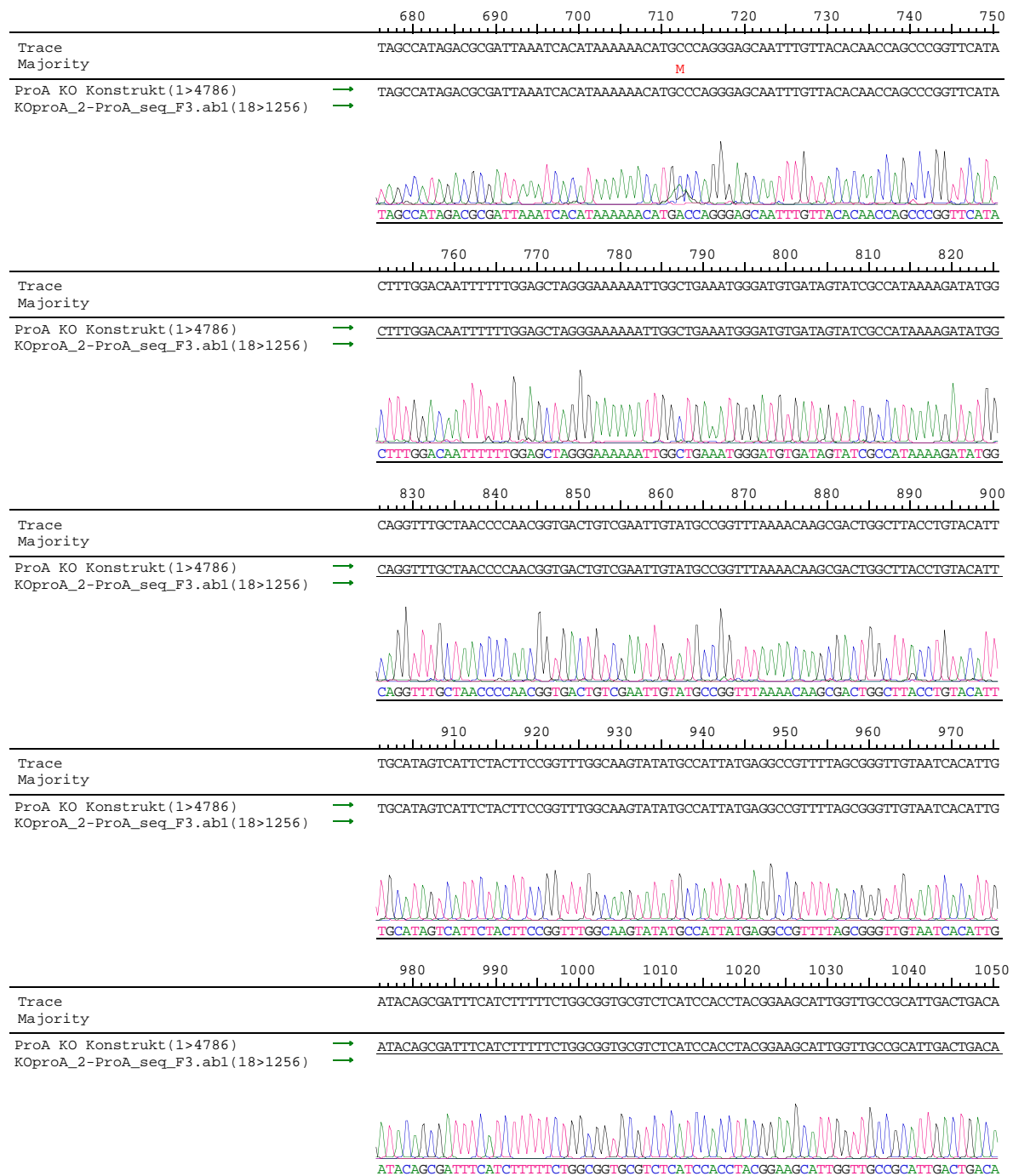
		10 20 30 40 50 60 70
Trace		TTGATTTTCAGTTAACGAAGCATGTCCATAAATGGACGGTTCTCGGGAGCCTAAAAGGTTTAGATTAGGACCATGT
Majority		
ProA KO Konstrukt (l>4786)	→	TTGATTTTCAGTTAACGAAGCATGTCCATAAATGGACGGTTCTCGGGAGCCTAAAAGGTTTAGATTAGGACCATGT
		80 90 100 110 120 130 140 150
Trace		AATACTAGAAATTTTTCATTACACATCGGTATAGTCTGAGATTTCAGATTTCGCTGAACTTTATGAACATGT
Majority		
ProA KO Konstrukt (l>4786)	→	AATACTAGAAATTTTTCATTACACATCGGTATAGTCTGAGATTTCAGATTTCGCTGAACTTTATGAACATGT
		160 170 180 190 200 210 220
Trace		CTATATATCTGCGAGGATATCGGCAAGATCTCCGCAAGTTTAGCAAGAAATTTATATTTAGTAAAAAGCAATGG
Majority		
ProA KO Konstrukt (l>4786)	→	CTATATATCTGCGAGGATATCGGCAAGATCTCCGCAAGTTTAGCAAGAAATTTATATTTAGTAAAAAGCAATGG
		230 240 250 260 270 280 290 300
Trace		ATTGTACTTAAAGAGTGTACCGATTTTAGGATTATGATATTTTATTTATTTCTTGAGCCAGGAAGAGCTTATGT
Majority		
ProA KO Konstrukt (l>4786)	→	ATTGTACTTAAAGAGTGTACCGATTTTAGGATTATGATATTTTATTTATTTCTTGAGCCAGGAAGAGCTTATGT
		310 320 330 340 350 360 370
Trace		CTAAAACGTTTATAACAGATGTCACCTTGCGTGATGCCCATCAATGCTTAATCGCTACAAGAAATGCGTACTGAAG
Majority		
ProA KO Konstrukt (l>4786)	→	CTAAAACGTTTATAACAGATGTCACCTTGCGTGATGCCCATCAATGCTTAATCGCTACAAGAAATGCGTACTGAAG
		380 390 400 410 420 430 440 450
Trace		ATATGTTGCCAATCTGTAATAAAATGGATGATGTAGGATTTTGGGCTATGGAAGTCTGGGAGGCGCTACTTTTG
Majority		
ProA KO Konstrukt (l>4786)	→	ATATGTTGCCAATCTGTAATAAAATGGATGATGTAGGATTTTGGGCTATGGAAGTCTGGGAGGCGCTACTTTTG
		460 470 480 490 500 510 520
Trace		ATGCCTGTTTTCGATTTTAAAGGAAGATCCCTGGTCAAGATTGCGTCAACTTCGCCAGGCGTTACCGAATACTC
Majority		
ProA KO Konstrukt (l>4786)	→	ATGCCTGTTTTCGATTTTAAAGGAAGATCCCTGGTCAAGATTGCGTCAACTTCGCCAGGCGTTACCGAATACTC
		530 540 550 560 570 580 590 600
Trace		AACTCTCCATGCTGTAAAGAGGTCAAAACTTGTAGGCTATAGGAATTATGCAGATGATGTAGTCCGAGCGTTTG
Majority		
ProA KO Konstrukt (l>4786)	→	AACTCTCCATGCTGTAAAGAGGTCAAAACTTGTAGGCTATAGGAATTATGCAGATGATGTAGTCCGAGCGTTTG
		610 620 630 640 650 660 670
Trace		TTAAATTGGCCGTAATAATGGAGTGGATGATTTTCGTGTGTTTGATGCTTTAATGACGCGGAAACCTTAAAG
Majority		
ProA KO Konstrukt (l>4786)	→	TTAAATTGGCCGTAATAATGGAGTGGATGATTTTCGTGTGTTTGATGCTTTAATGACGCGGAAACCTTAAAG
KOproA_2-ProA_seq_F3.ab1 (18>1256)	→	TTAAATTGGCCGTAATAATGGAGTGGATGATTTTCGTGTGTTTGATGCTTTAATGACGCGGAAACCTTAAAG

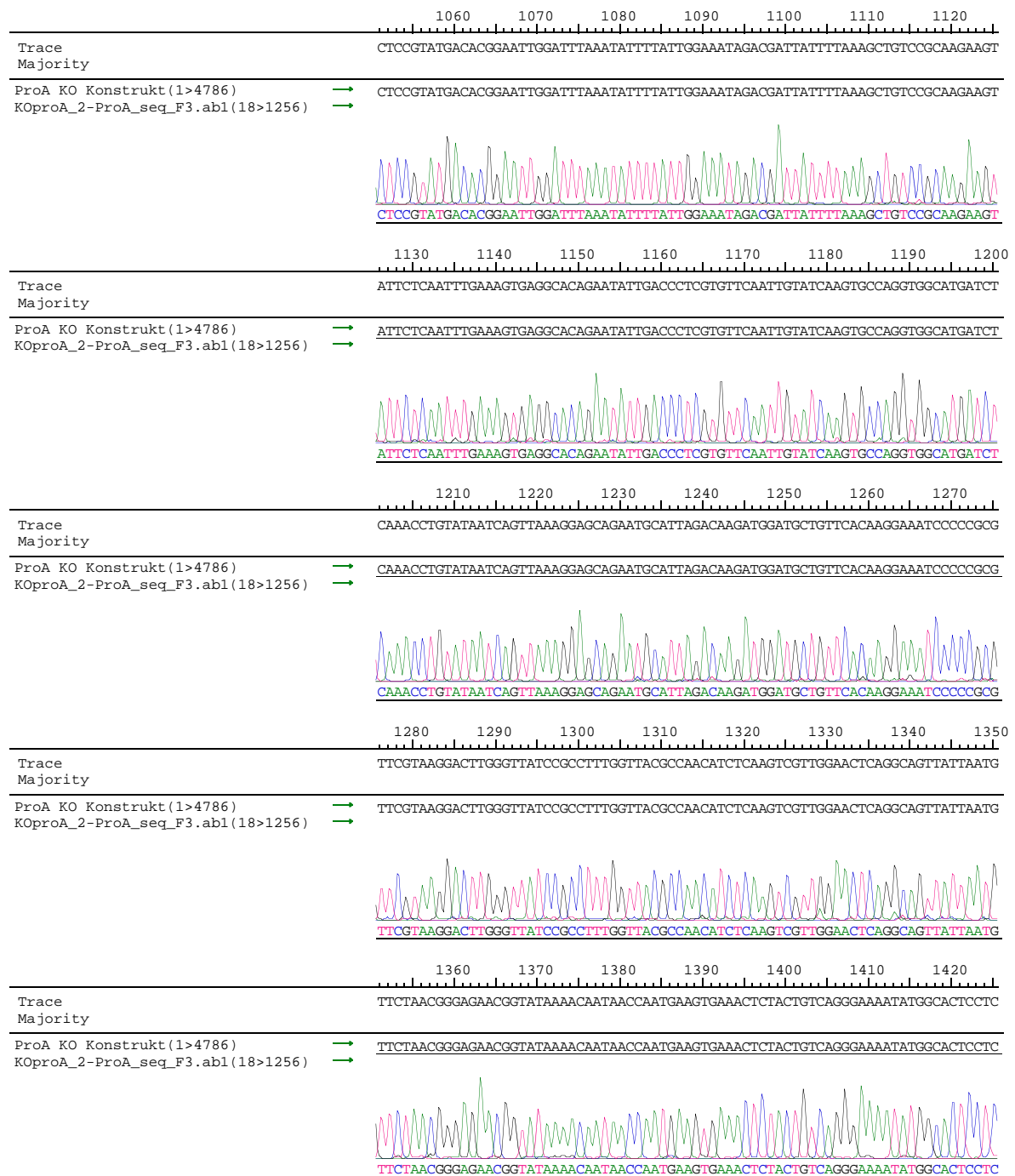


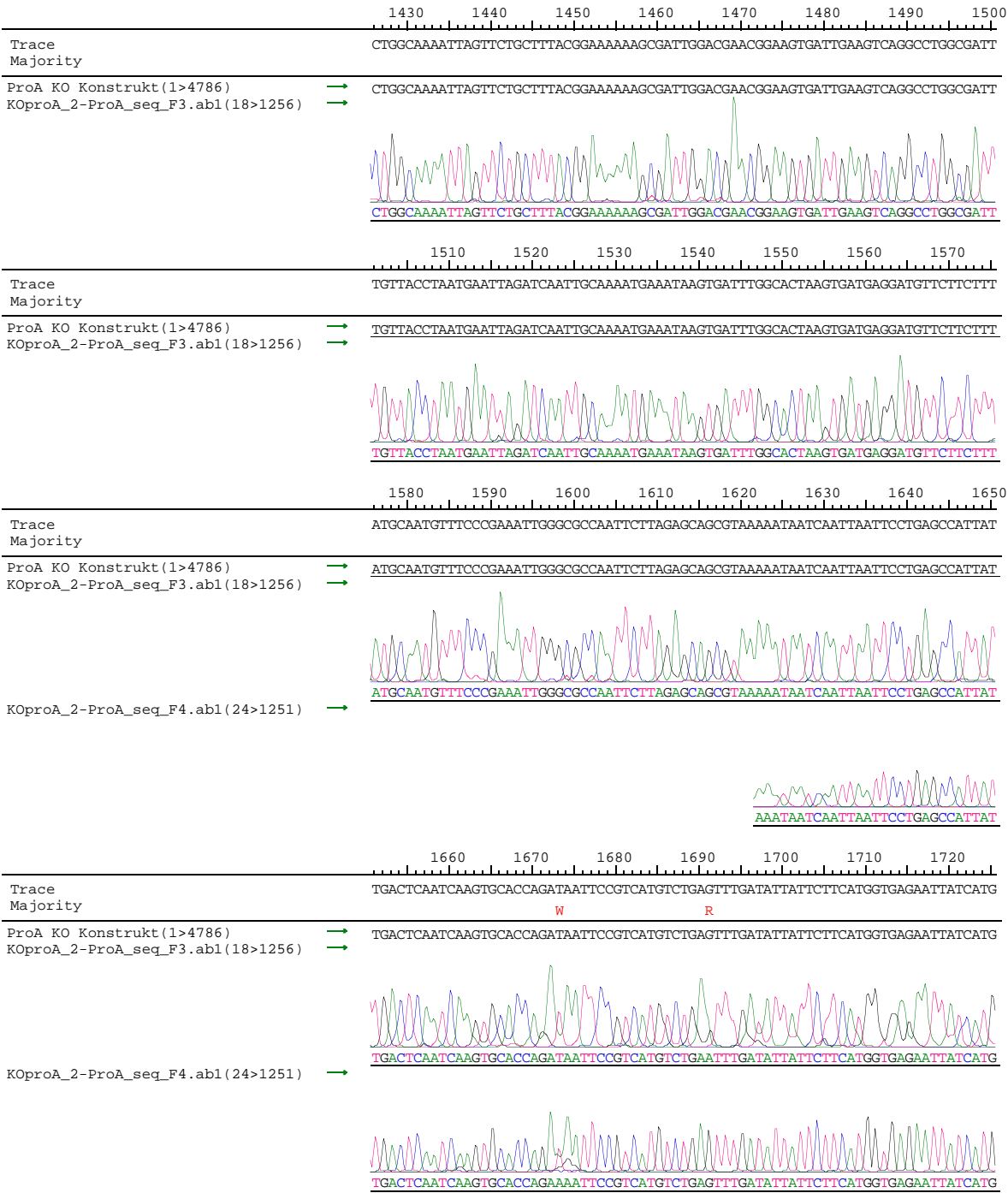
8 Anhang

Montag, 23. Juni 2014 18:10
Project: Untitled Contig 1

Page 2

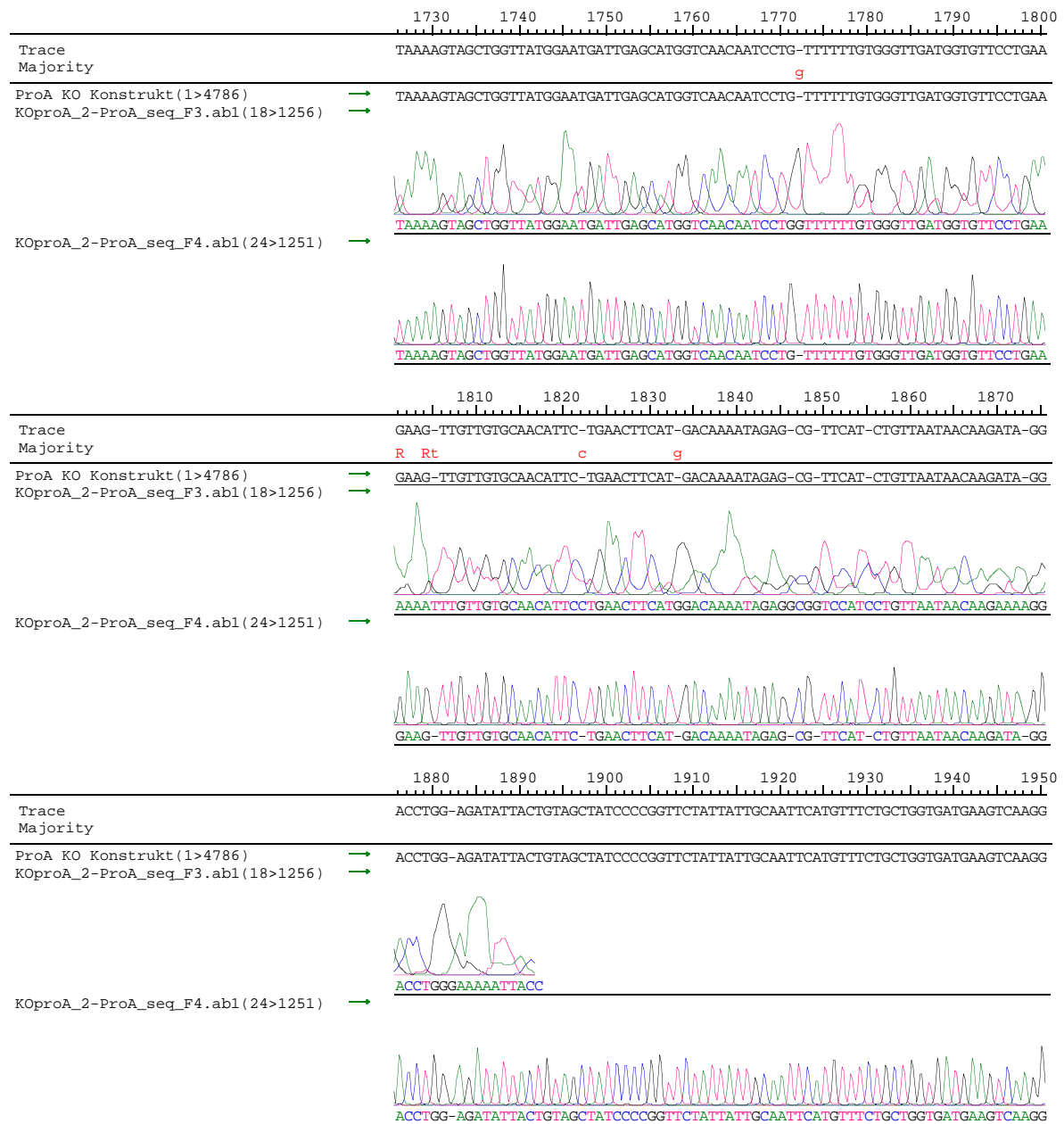






Montag, 23. Juni 2014 18:10
Project: Untitled Contig 1

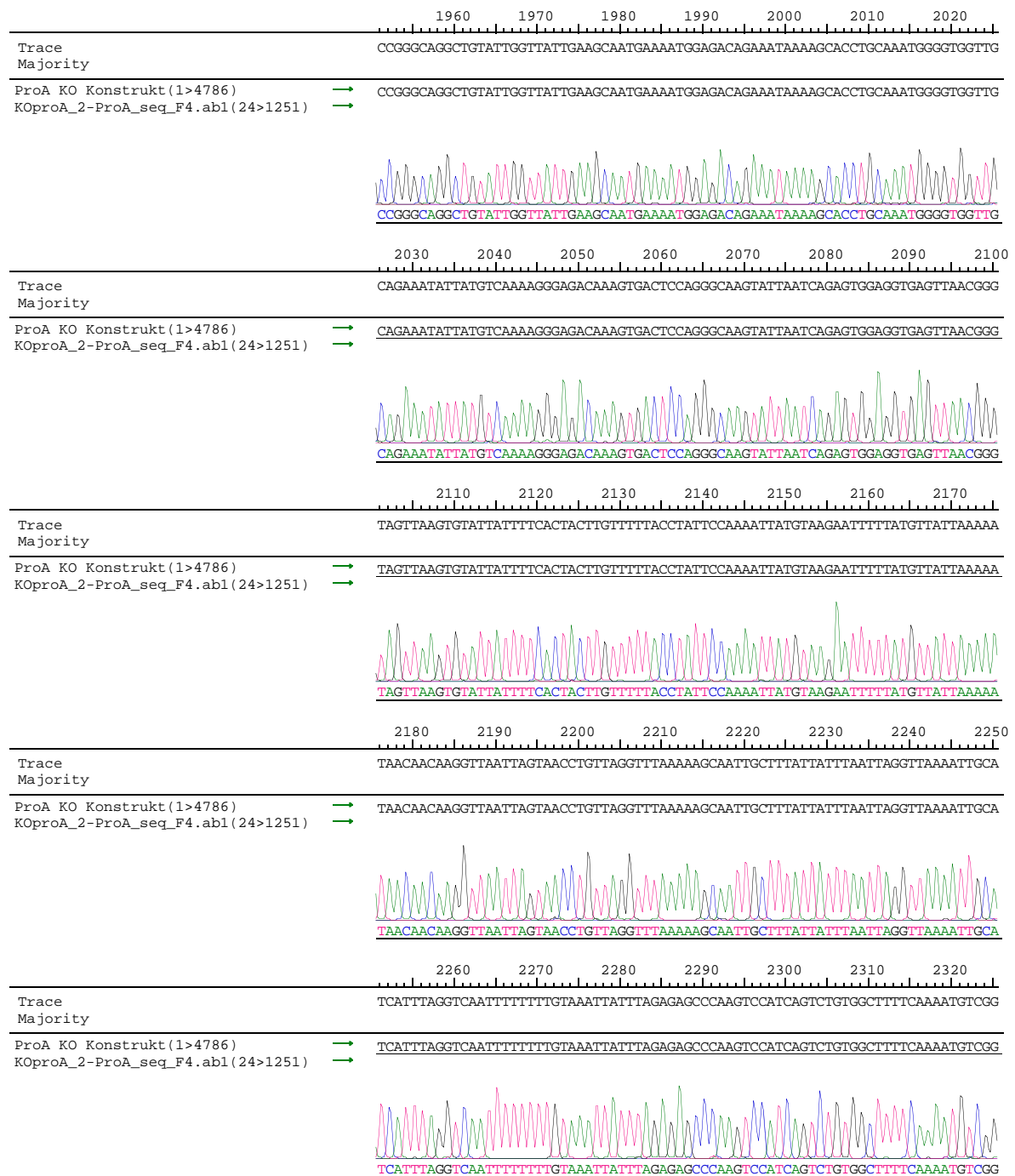
Page 5

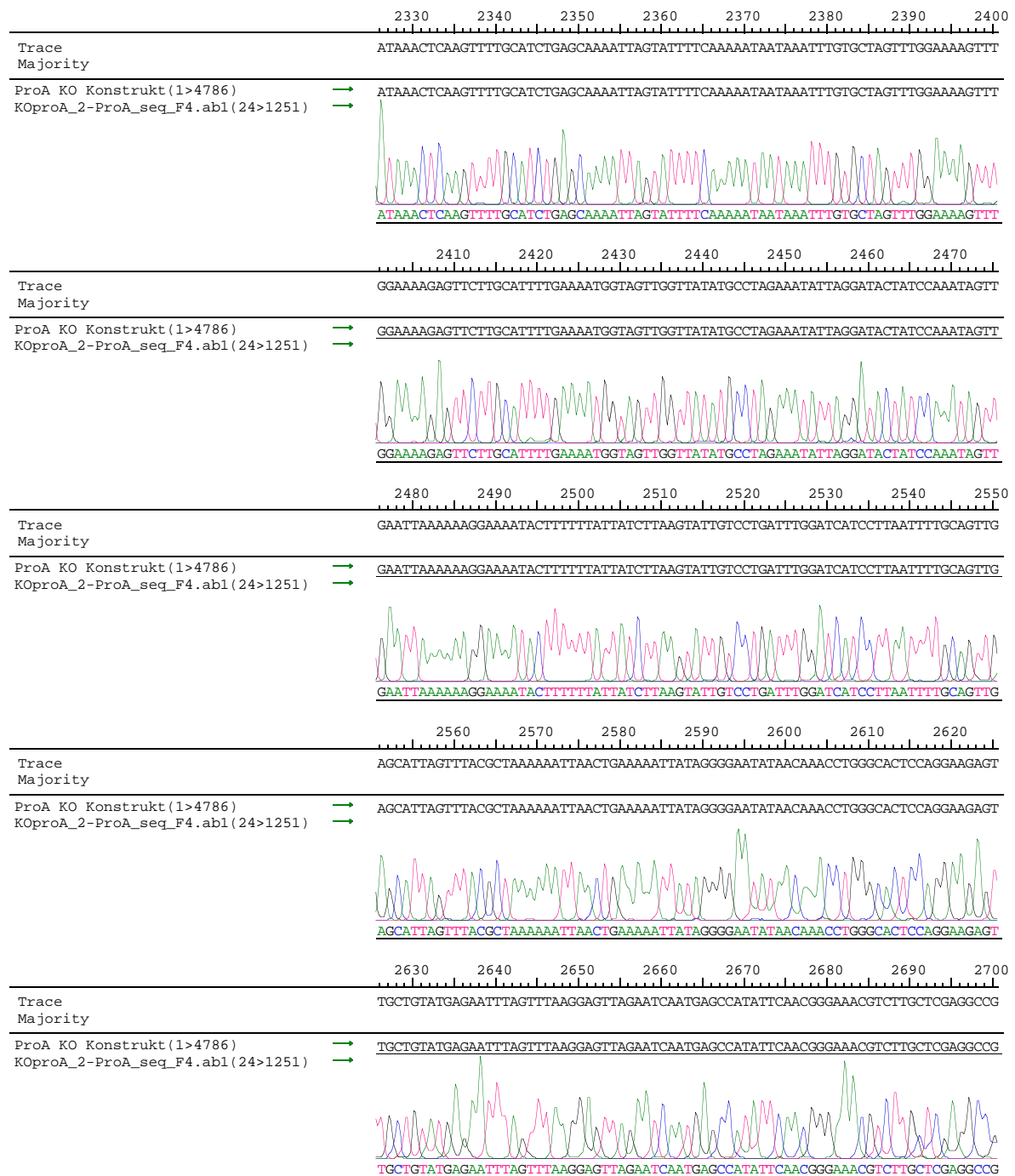


8 Anhang

Montag, 23. Juni 2014 18:10
Project: Untitled Contig 1

Page 6

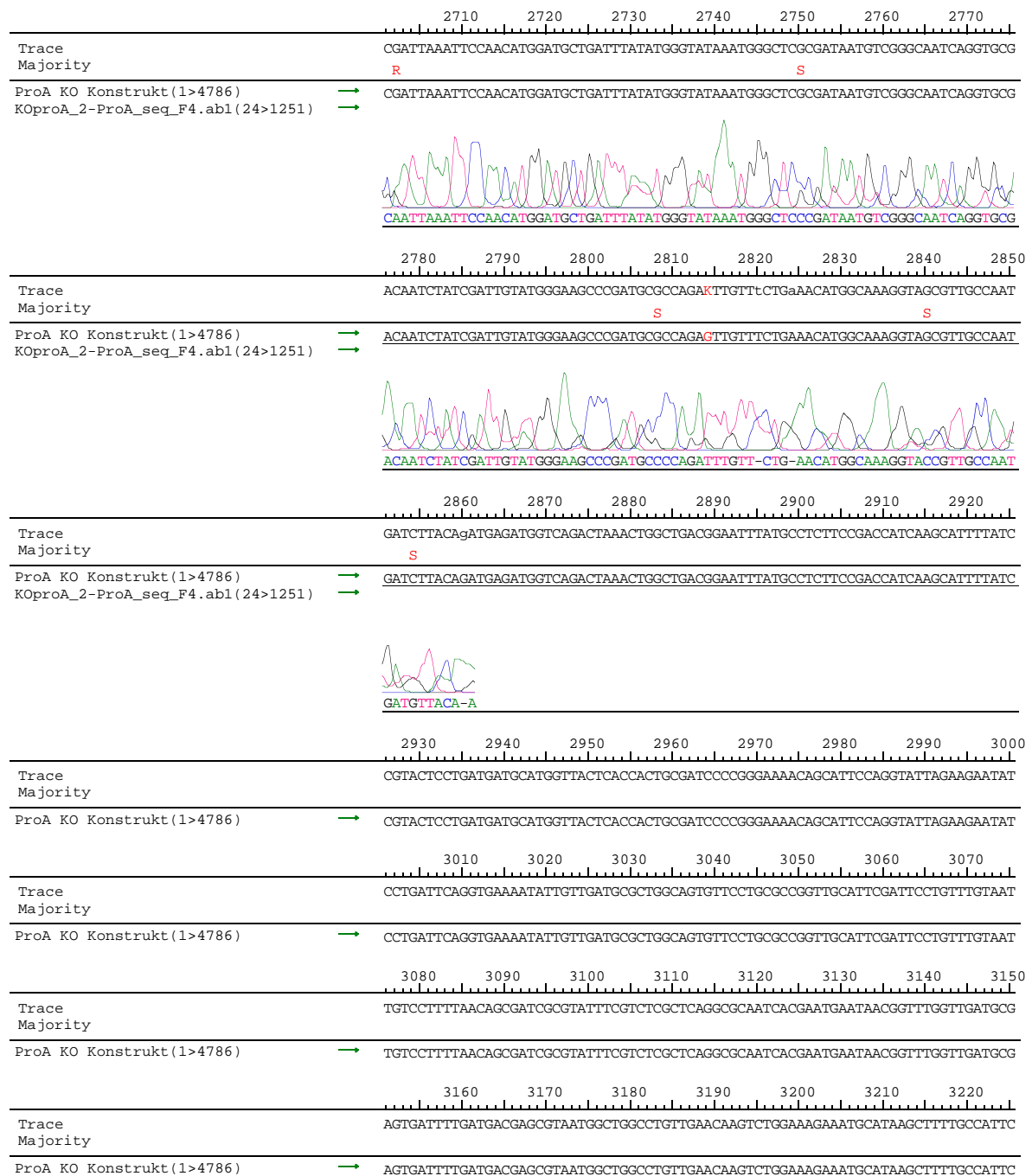




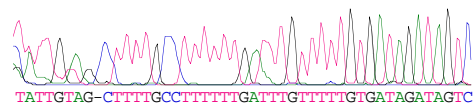
8 Anhang

Montag, 23. Juni 2014 18:10
Project: Untitled Contig 1

Page 8



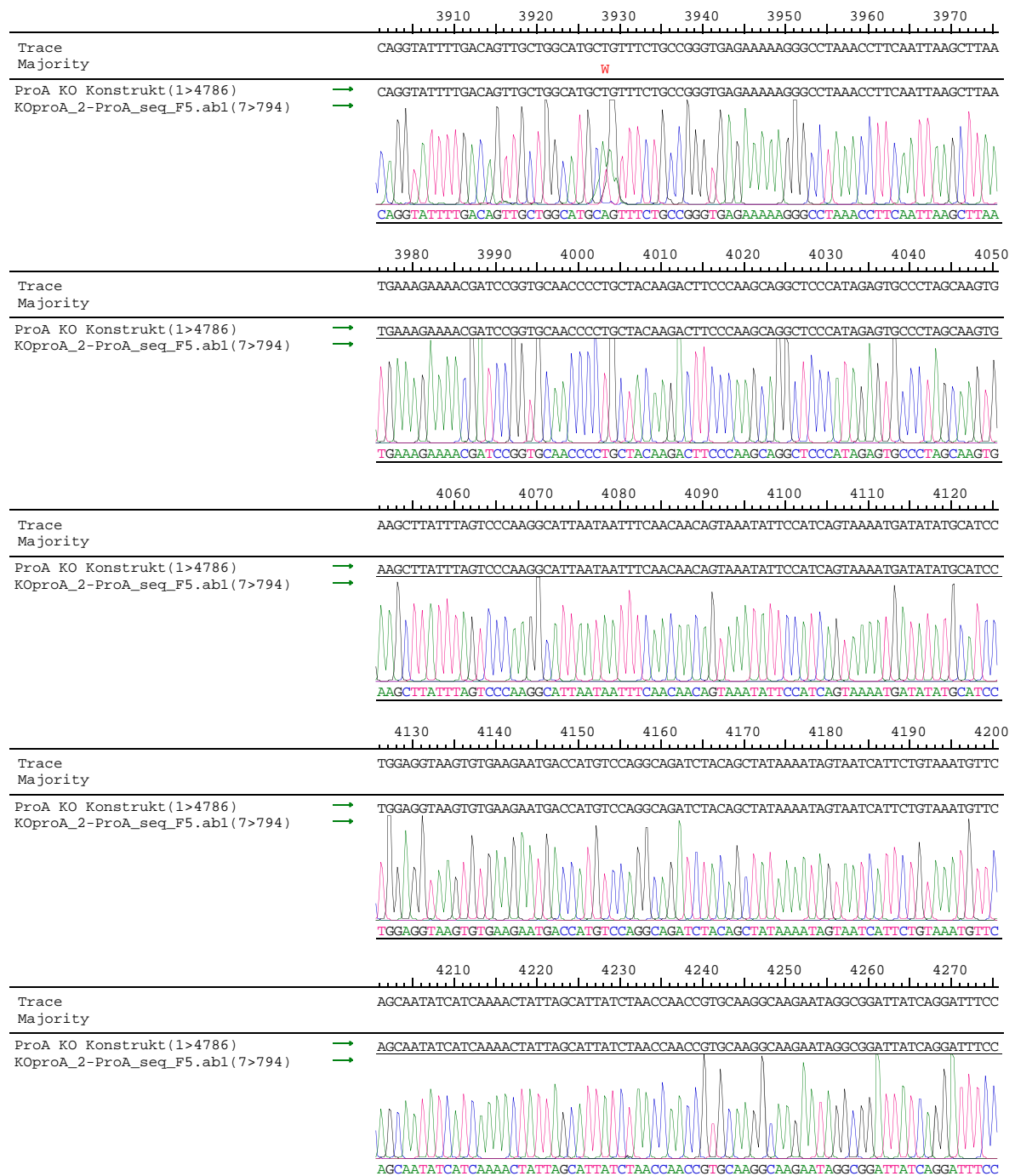
		3230 3240 3250 3260 3270 3280 3290 3300
Trace		TCACCGGATTTCAGTCGTCACCTCATGGTGATTTCTCACTTGATAACCTTATTTTGTACGAGGGGAAATTAATAGGT
Majority		
ProA KO Konstrukt (1>4786)	→	TCACCGGATTTCAGTCGTCACCTCATGGTGATTTCTCACTTGATAACCTTATTTTGTACGAGGGGAAATTAATAGGT
		3310 3320 3330 3340 3350 3360 3370
Trace		TGTATTGATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATACCAGGATCTTGCCATCCTATGGAACGCTCGGTGAG
Majority		
ProA KO Konstrukt (1>4786)	→	TGTATTGATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATACCAGGATCTTGCCATCCTATGGAACGCTCGGTGAG
		3380 3390 3400 3410 3420 3430 3440 3450
Trace		TTTCTCCTTCATTACAGAAACGGCTTTTCAAAAATATGGTATTGATAATCCTGATATGAATAAATTGCAGTTT
Majority		
ProA KO Konstrukt (1>4786)	→	TTTCTCCTTCATTACAGAAACGGCTTTTCAAAAATATGGTATTGATAATCCTGATATGAATAAATTGCAGTTT
		3460 3470 3480 3490 3500 3510 3520
Trace		CATTGTGATGCTCGATGAGTTTCTAAATTCATTTTATTGATTGATAAAATTCAGCCAGAAGTCGACTGATGACT
Majority		
ProA KO Konstrukt (1>4786)	→	CATTGTGATGCTCGATGAGTTTCTAAATTCATTTTATTGATTGATAAAATTCAGCCAGAAGTCGACTGATGACT
		3530 3540 3550 3560 3570 3580 3590 3600
Trace		TCTGGCTTTTCCATATGAATATGGTGCCACCATCTAACTTCTCAATTTTAATATTTTACTGCTTGAATCCTT
Majority		
ProA KO Konstrukt (1>4786)	→	TCTGGCTTTTCCATATGAATATGGTGCCACCATCTAACTTCTCAATTTTAATATTTTACTGCTTGAATCCTT
		3610 3620 3630 3640 3650 3660 3670
Trace		GCTTTTCATCTTATCCGAATCAAATGAAATCCTTTGCTGGCCCAAATAAGGTAAGTTTGAGCTTTTATTCTGTGA
Majority		
ProA KO Konstrukt (1>4786)	→	GCTTTTCATCTTATCCGAATCAAATGAAATCCTTTGCTGGCCCAAATAAGGTAAGTTTGAGCTTTTATTCTGTGA
		3680 3690 3700 3710 3720 3730 3740 3750
Trace		AGGCACGAAAGAACTTGTGCTTCAGTCATTTGTAATGGAGATGGGGCTAATAGCCTGCGATCGTGCTCCAATAA
Majority		
ProA KO Konstrukt (1>4786)	→	AGGCACGAAAGAACTTGTGCTTCAGTCATTTGTAATGGAGATGGGGCTAATAGCCTGCGATCGTGCTCCAATAA
		3760 3770 3780 3790 3800 3810 3820
Trace		TATAGACCATTTTCTTGTGTAATCCGCGTTGCAAAGTGACTTGGCAATATCCAGAGAAACATATCCTTTAAGC
Majority		
ProA KO Konstrukt (1>4786)	→	TATAGACCATTTTCTTGTGTAATCCGCGTTGCAAAGTGACTTGGCAATATCCAGAGAAACATATCCTTTAAGC
		3830 3840 3850 3860 3870 3880 3890 3900
Trace		GAGCGGGCAAGAGCAGCATGTTCAAACCTTATTGTAGCTTTTGCCTTTTGTGATTTGTTTGTGATAGATAGTC
Majority		
ProA KO Konstrukt (1>4786)	→	GAGCGGGCAAGAGCAGCATGTTCAAACCTTATTGTAGCTTTTGCCTTTTGTGATTTGTTTGTGATAGATAGTC
KOproA_2-ProA_seq_F5.ab1 (7>794)	→	

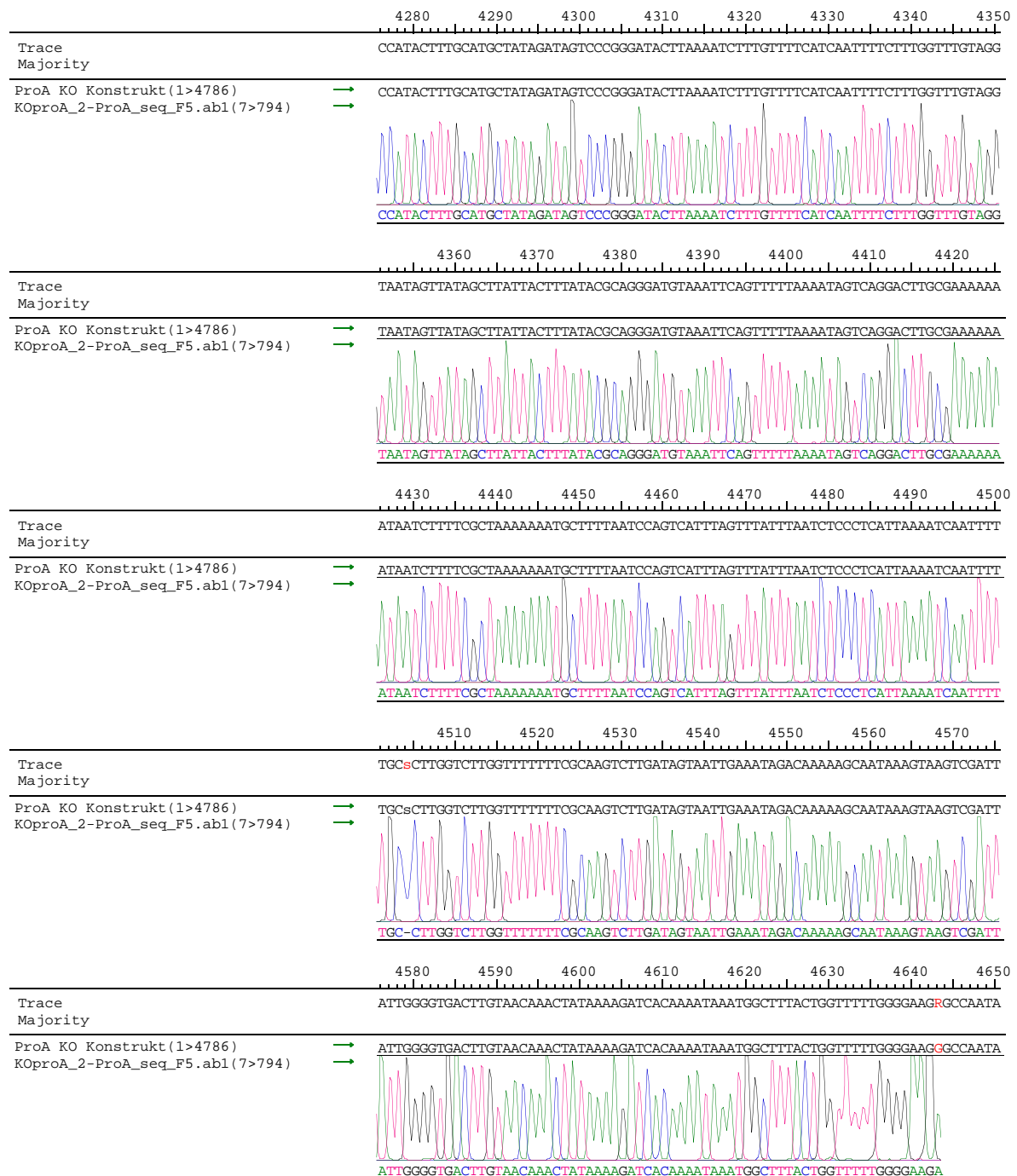


8 Anhang

Montag, 23. Juni 2014 18:10
Project: Untitled Contig 1

Page 10

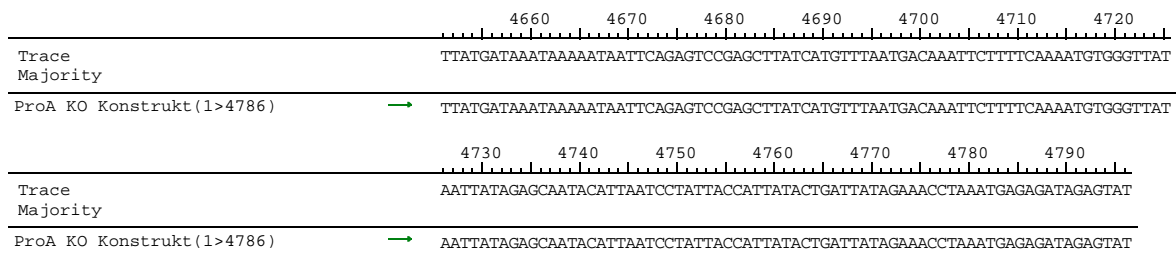




8 Anhang

Montag, 23. Juni 2014 18:10
Project: Untitled Contig 1

Page 12



8.4 Alignment der *proA*-Deletionsmutante (2/2)

Freitag, 21. März 2014 11:38
Project: Untitled Contig 1

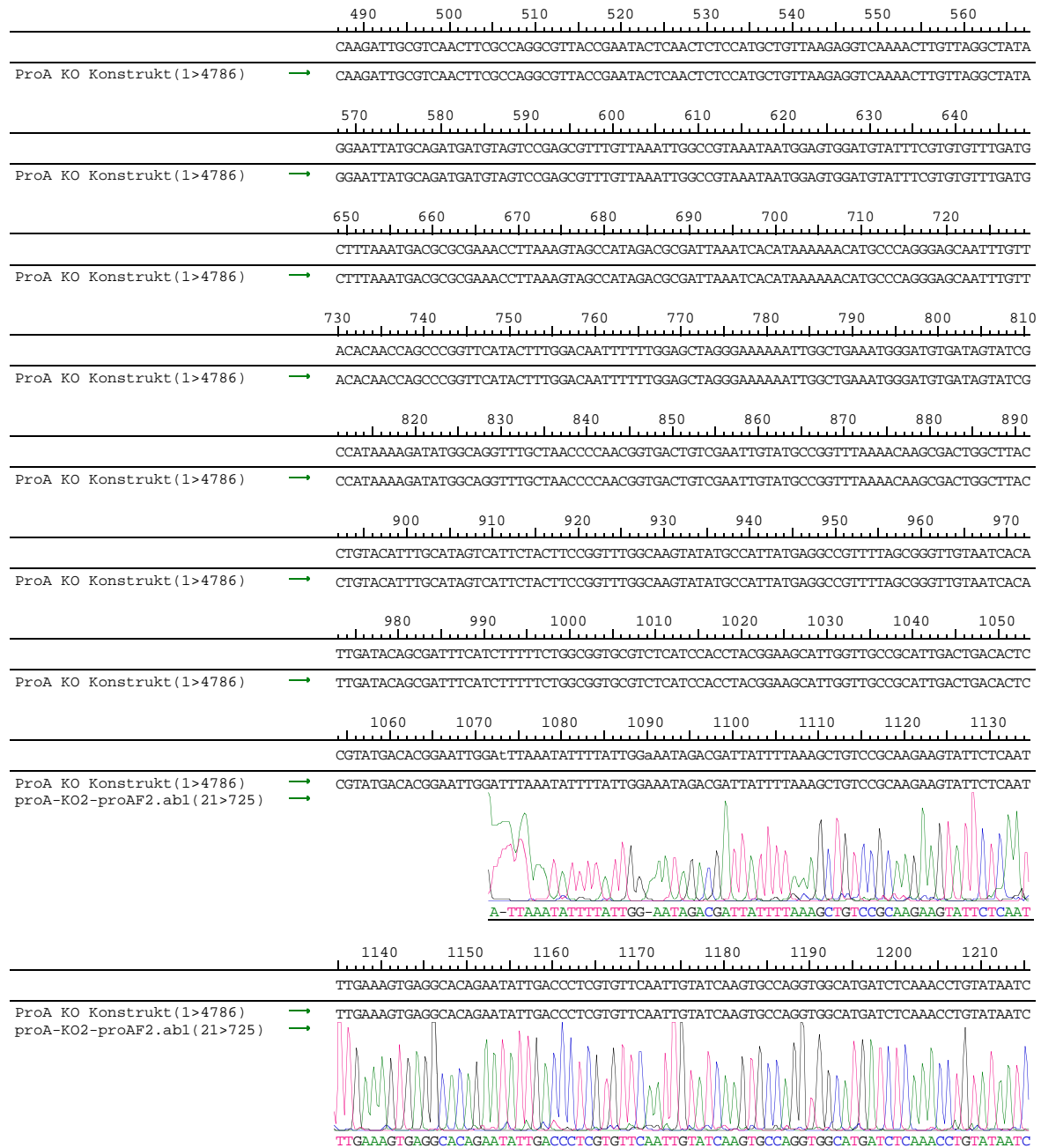
Page 1



8 Anhang

Freitag, 21. März 2014 11:38
Project: Untitled Contig 1

Page 2





8 Anhang

Freitag, 21. März 2014 11:38
Project: Untitled Contig 1

Page 4

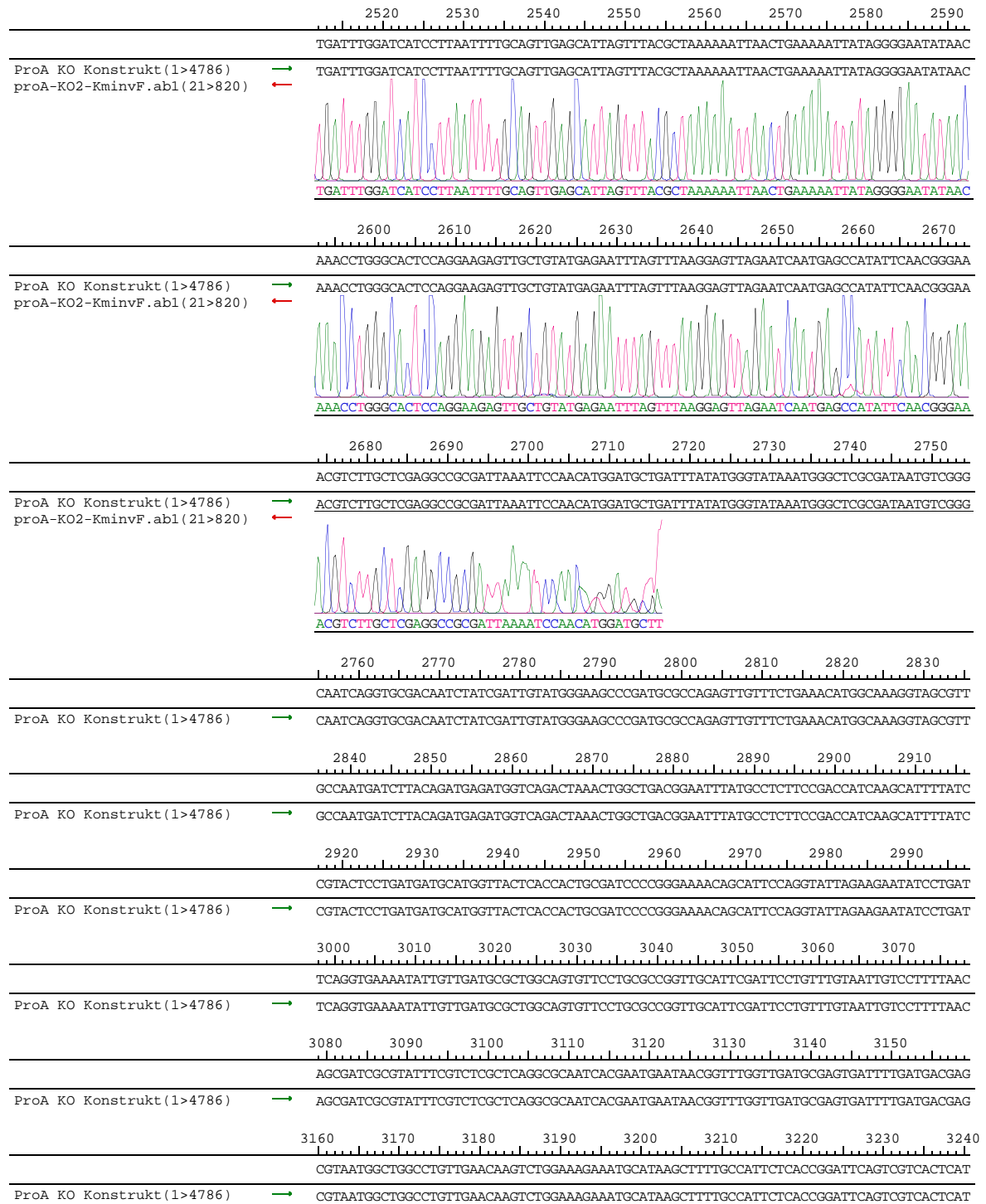


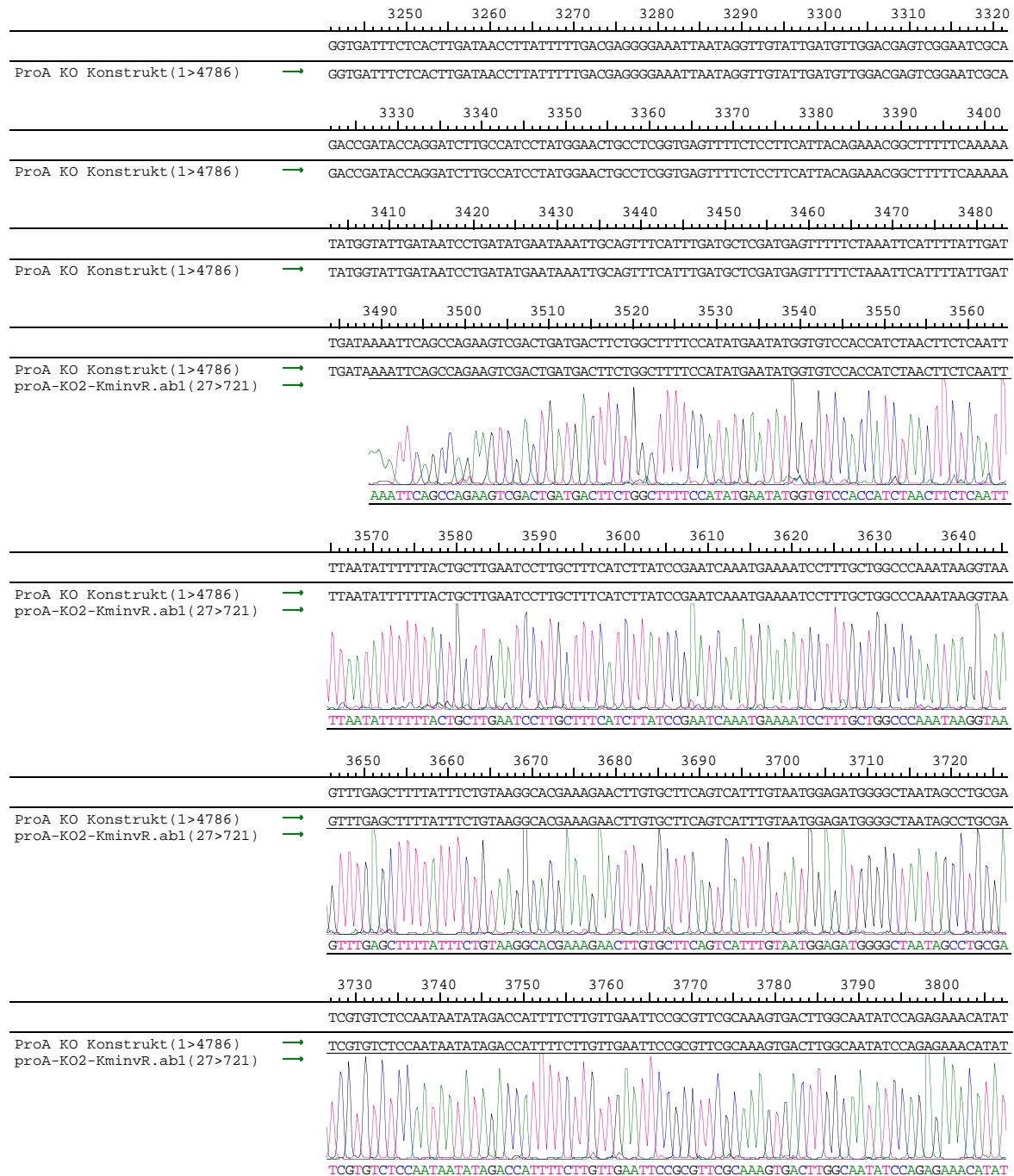


8 Anhang

Freitag, 21. März 2014 11:38
Project: Untitled Contig 1

Page 6



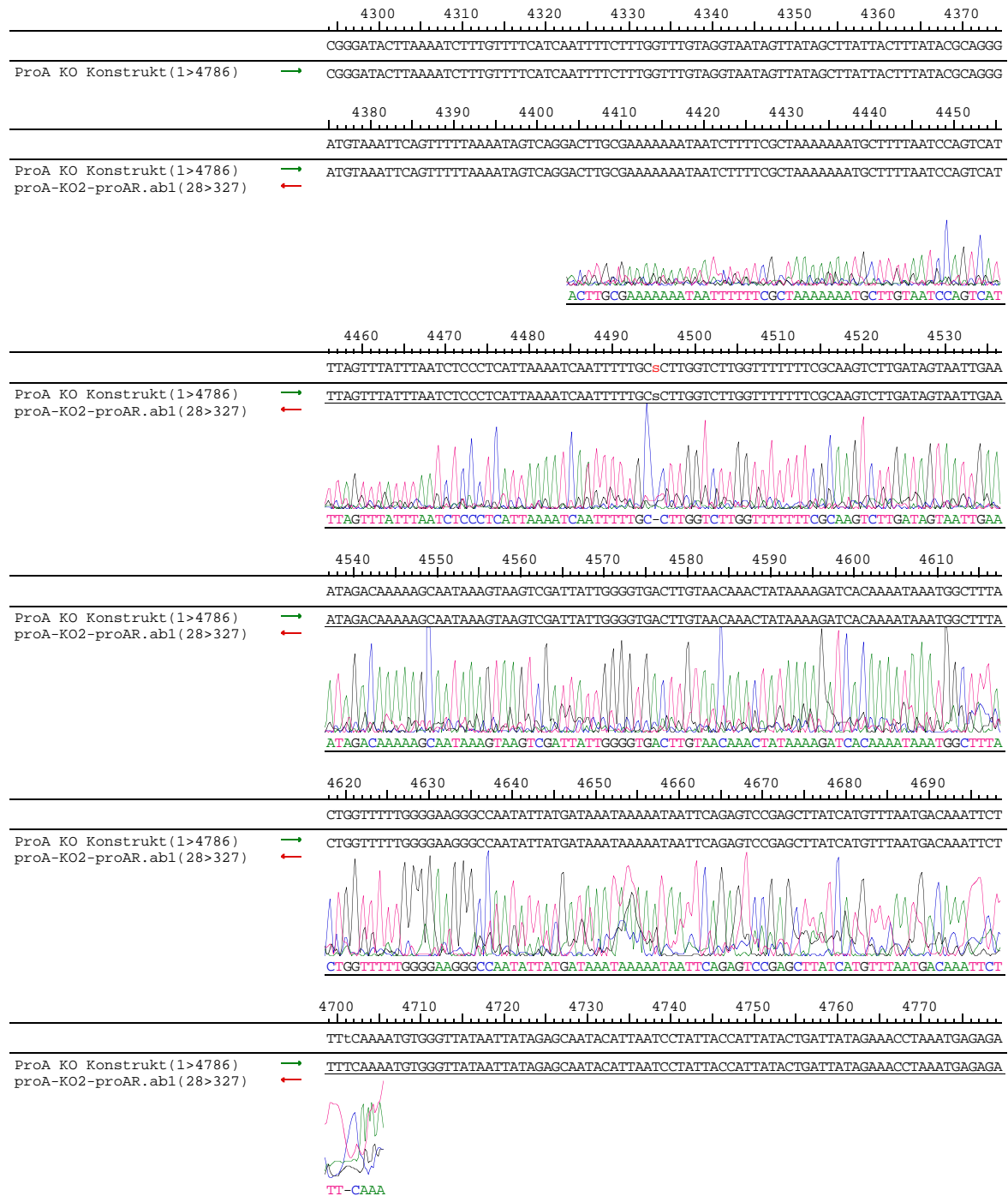


8 Anhang

Freitag, 21. März 2014 11:38
Project: Untitled Contig 1

Page 8






8 Anhang

Freitag, 21. März 2014 11:38
Project: Untitled Contig 1

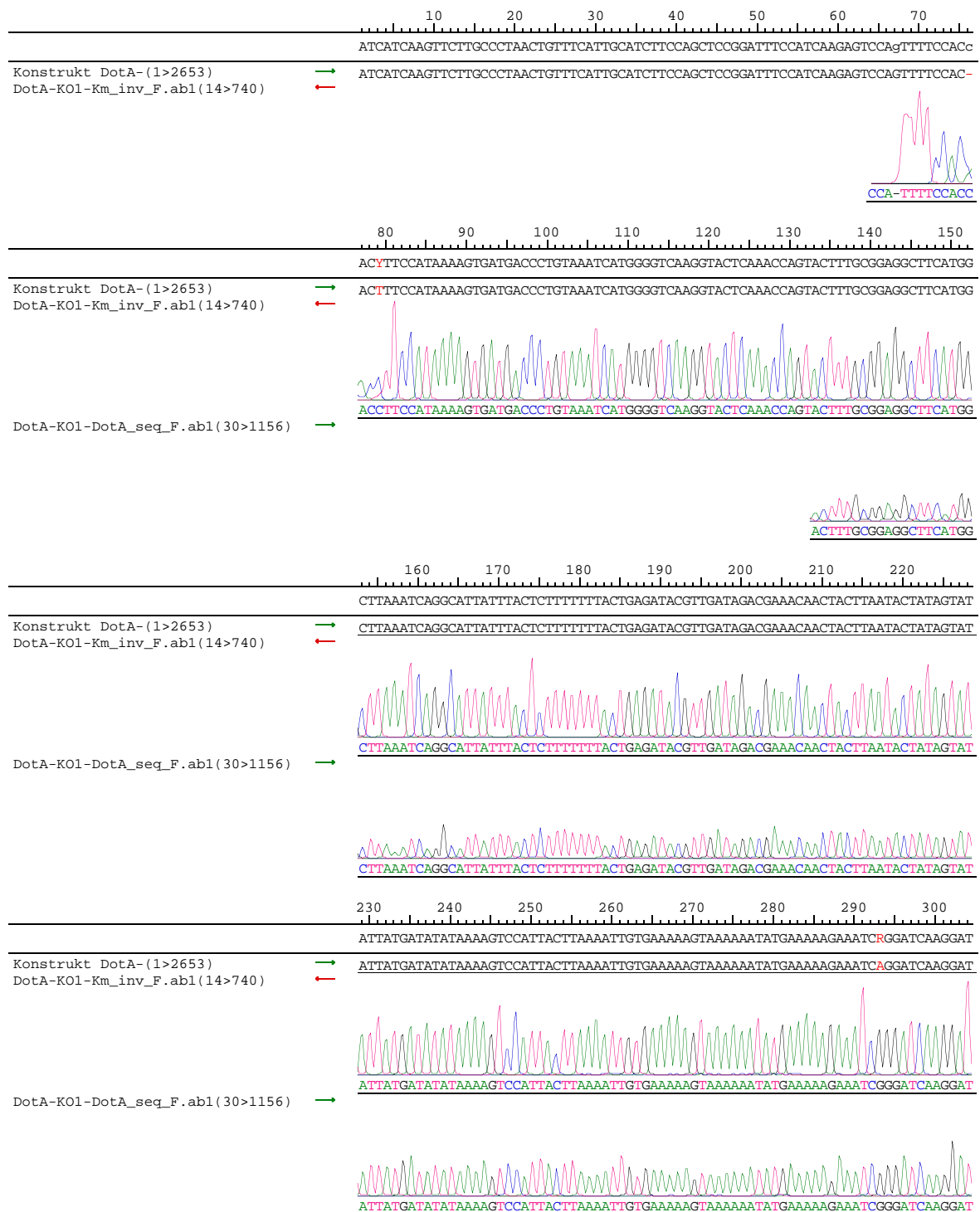
Page 10



8.5 Alignment der *dotA*-Deletionsmutante

Freitag, 28. März 2014 14:51
Project: Untitled Contig 1

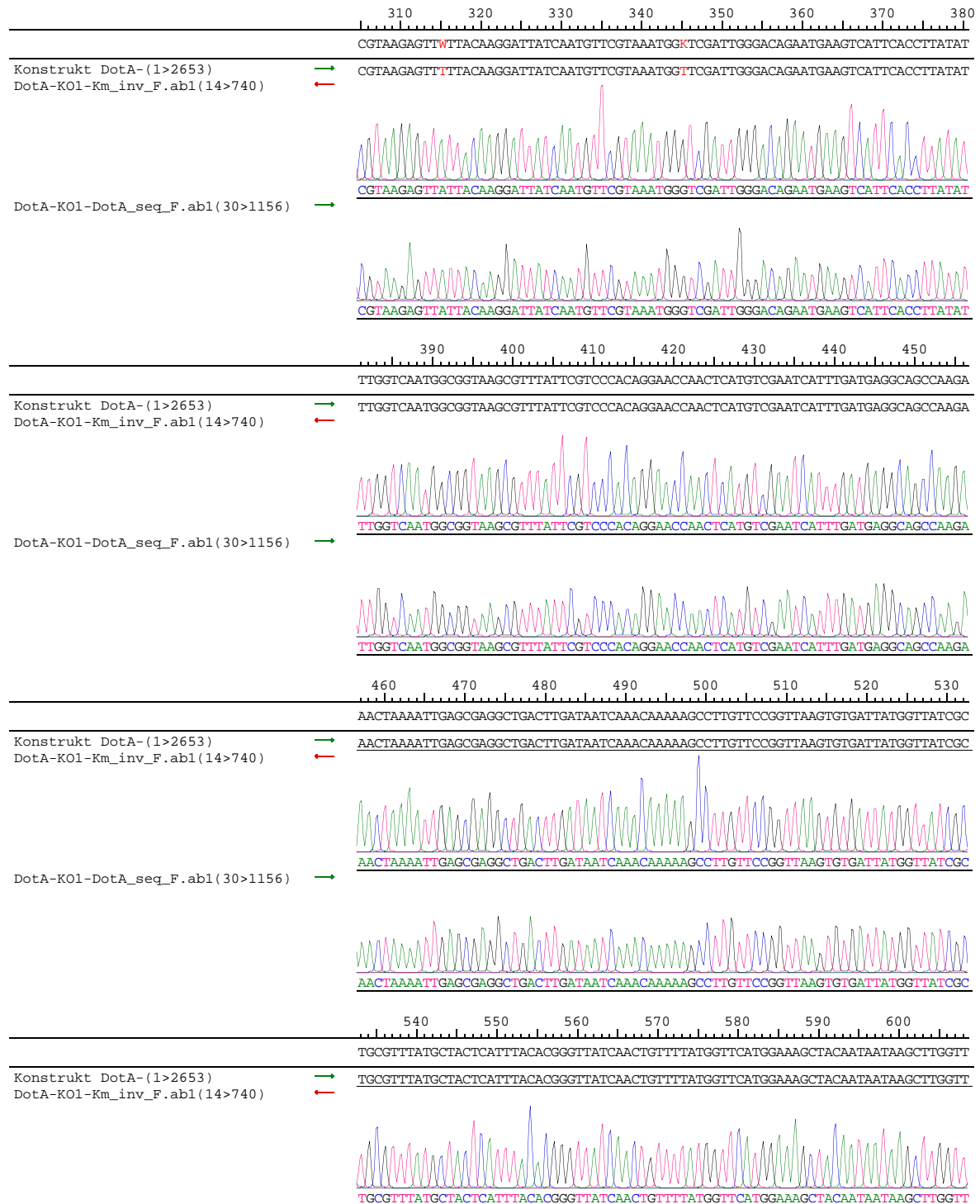
Page 1



8 Anhang

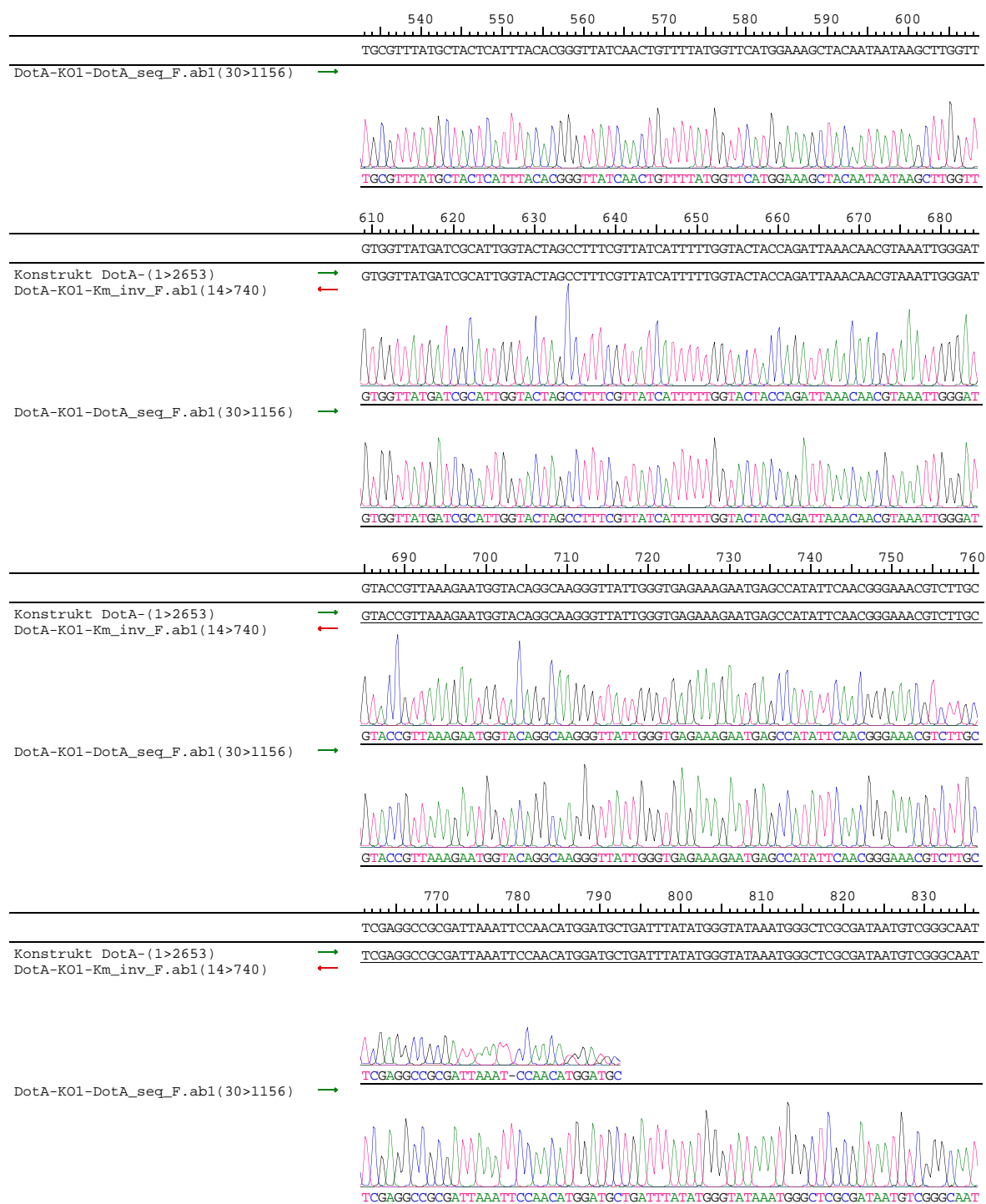
Freitag, 28. März 2014 14:51
Project: Untitled Contig 1

Page 2



Freitag, 28. März 2014 14:51
Project: Untitled Contig 1

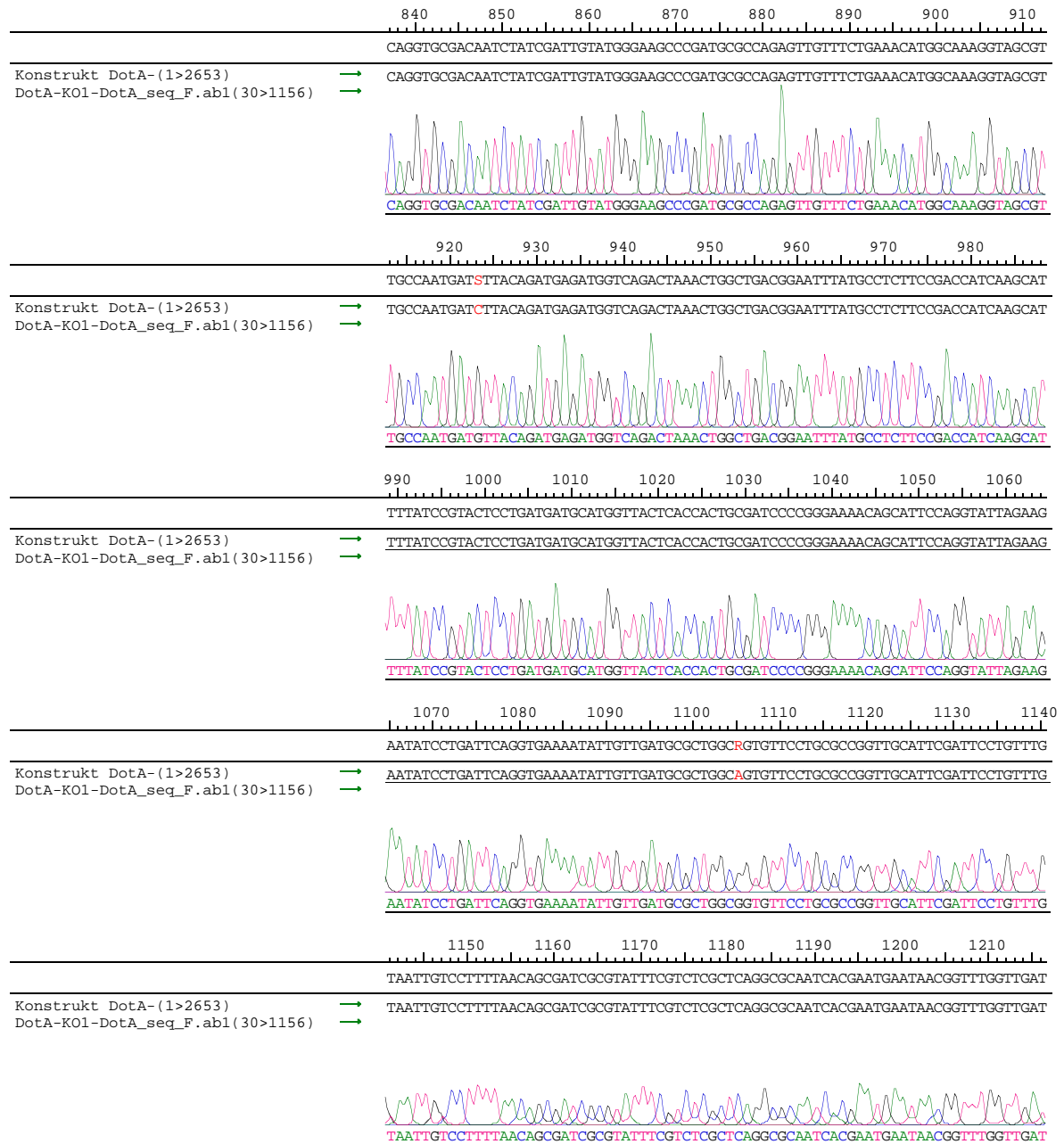
Page 3

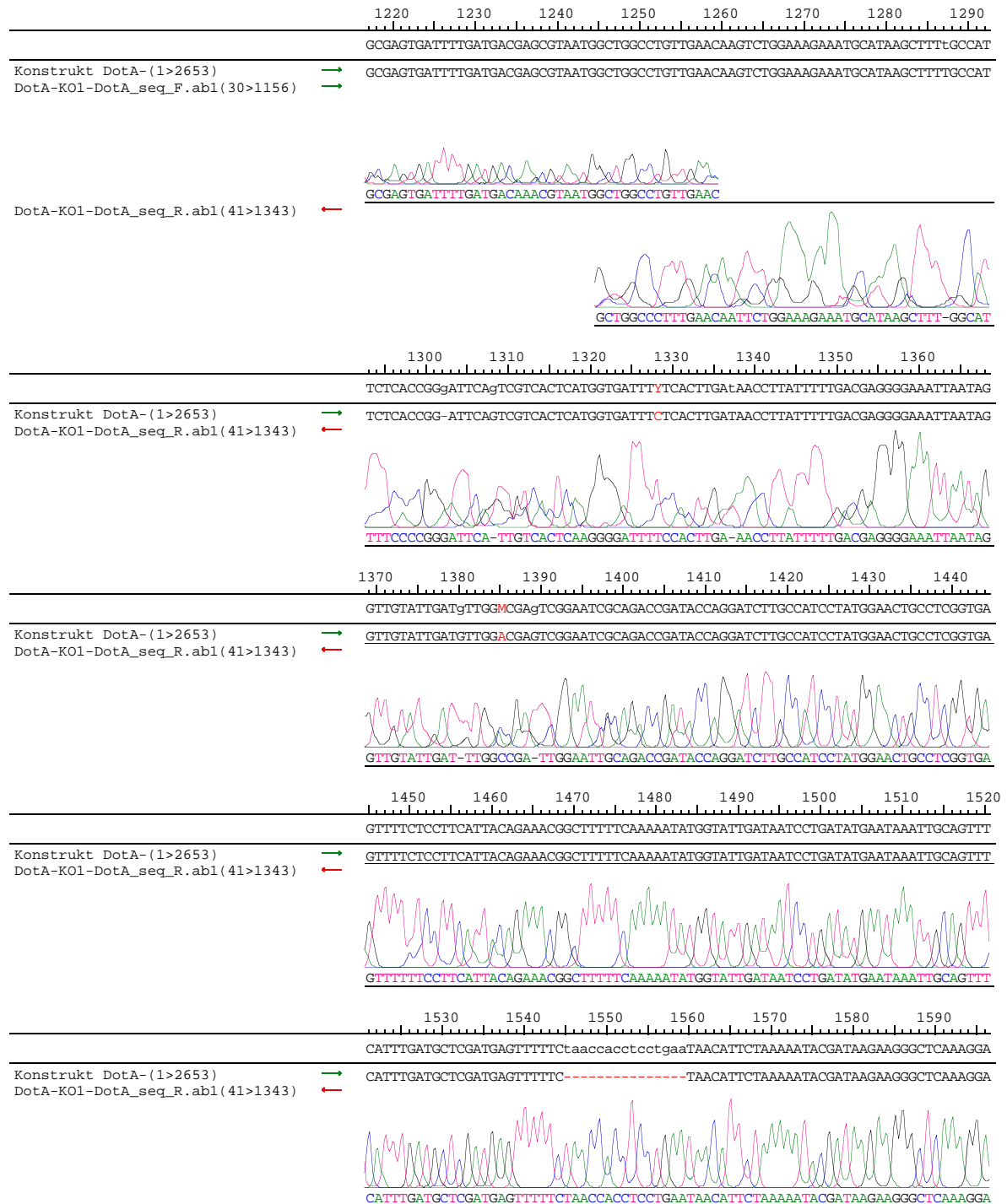


8 Anhang

Freitag, 28. März 2014 14:51
Project: Untitled Contig 1

Page 4

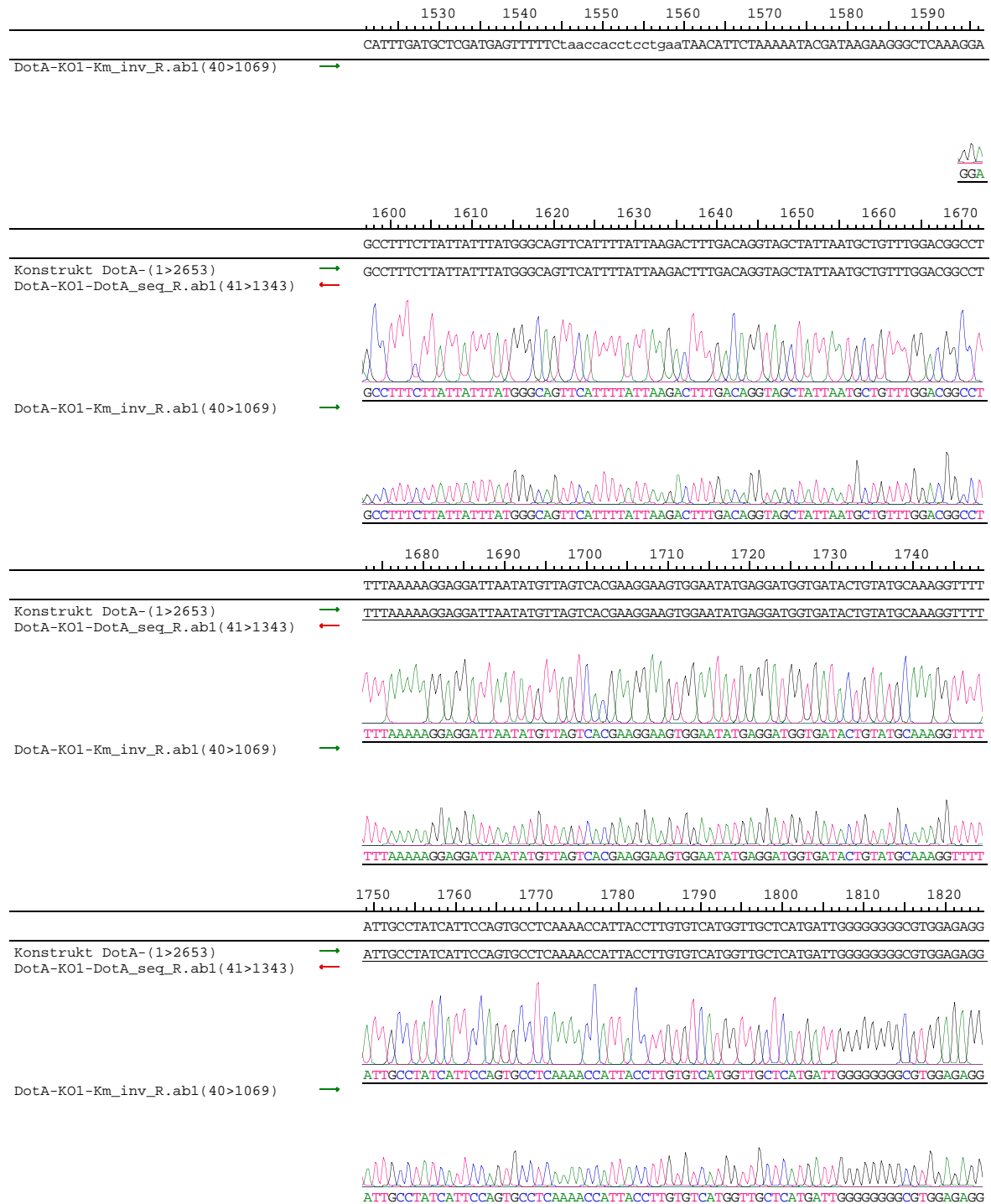


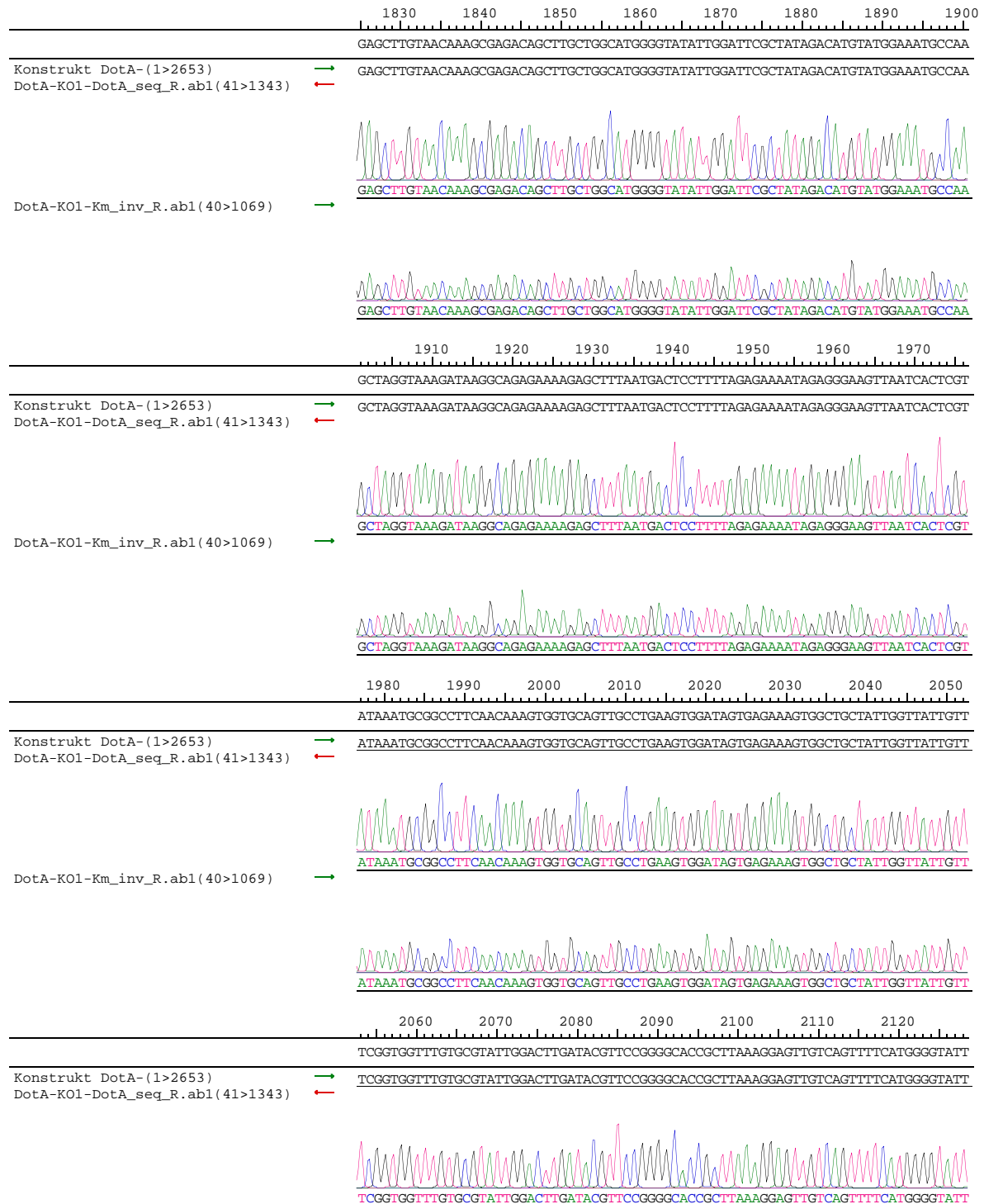


8 Anhang

Freitag, 28. März 2014 14:51
Project: Untitled Contig 1

Page 6

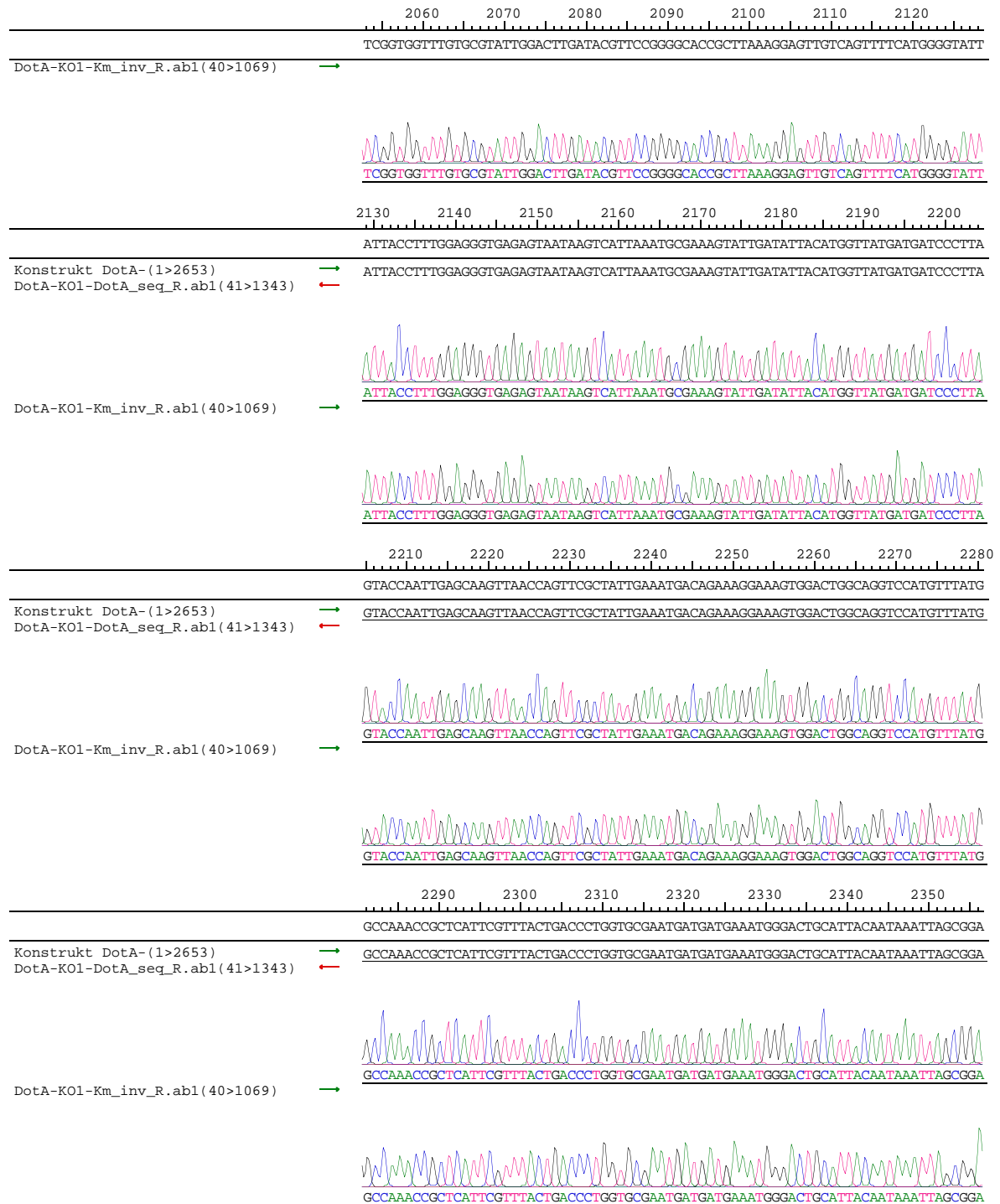


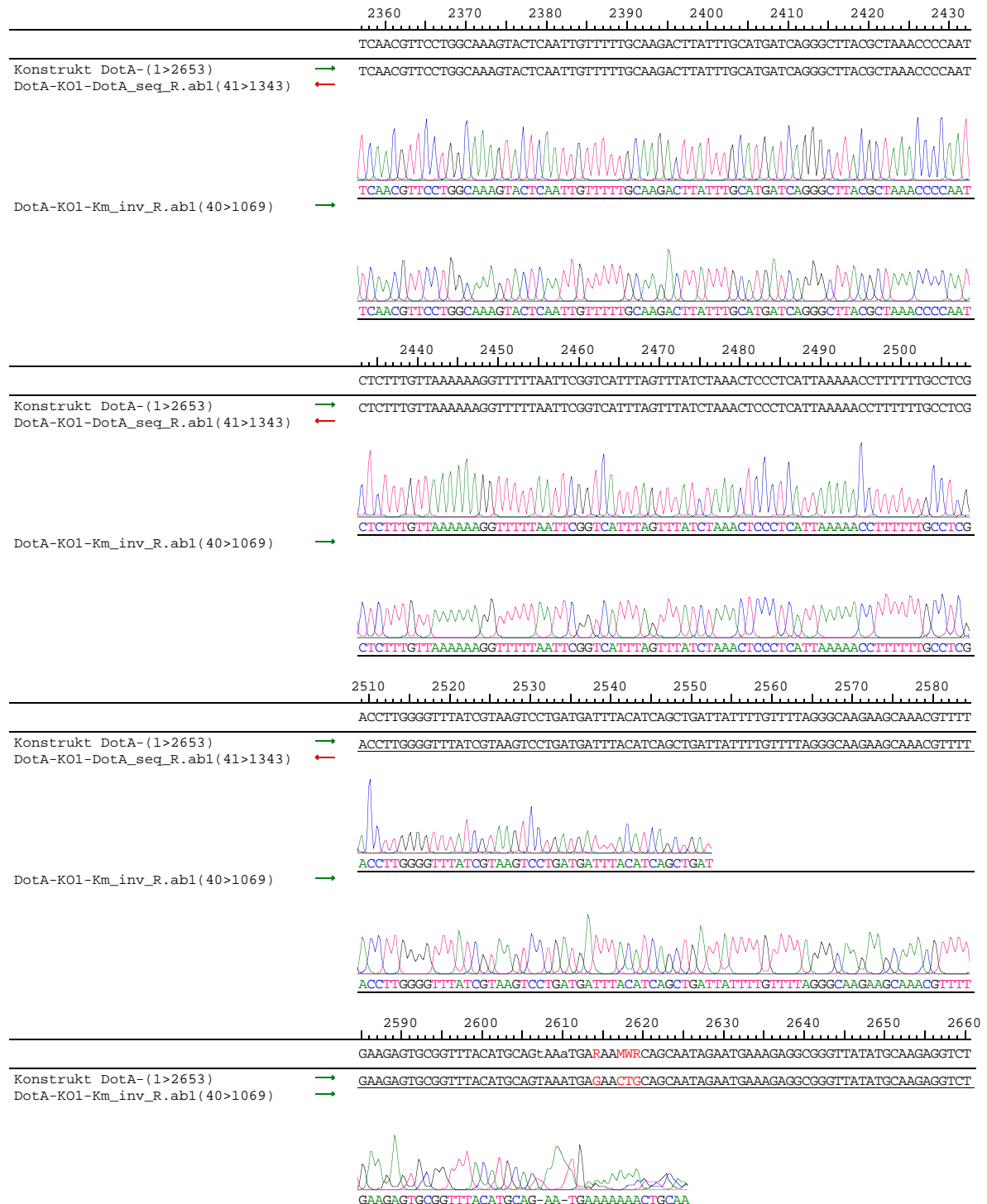


8 Anhang

Freitag, 28. März 2014 14:51
Project: Untitled Contig 1

Page 8





8 Anhang

Freitag, 28. März 2014 14:51
Project: Untitled Contig 1

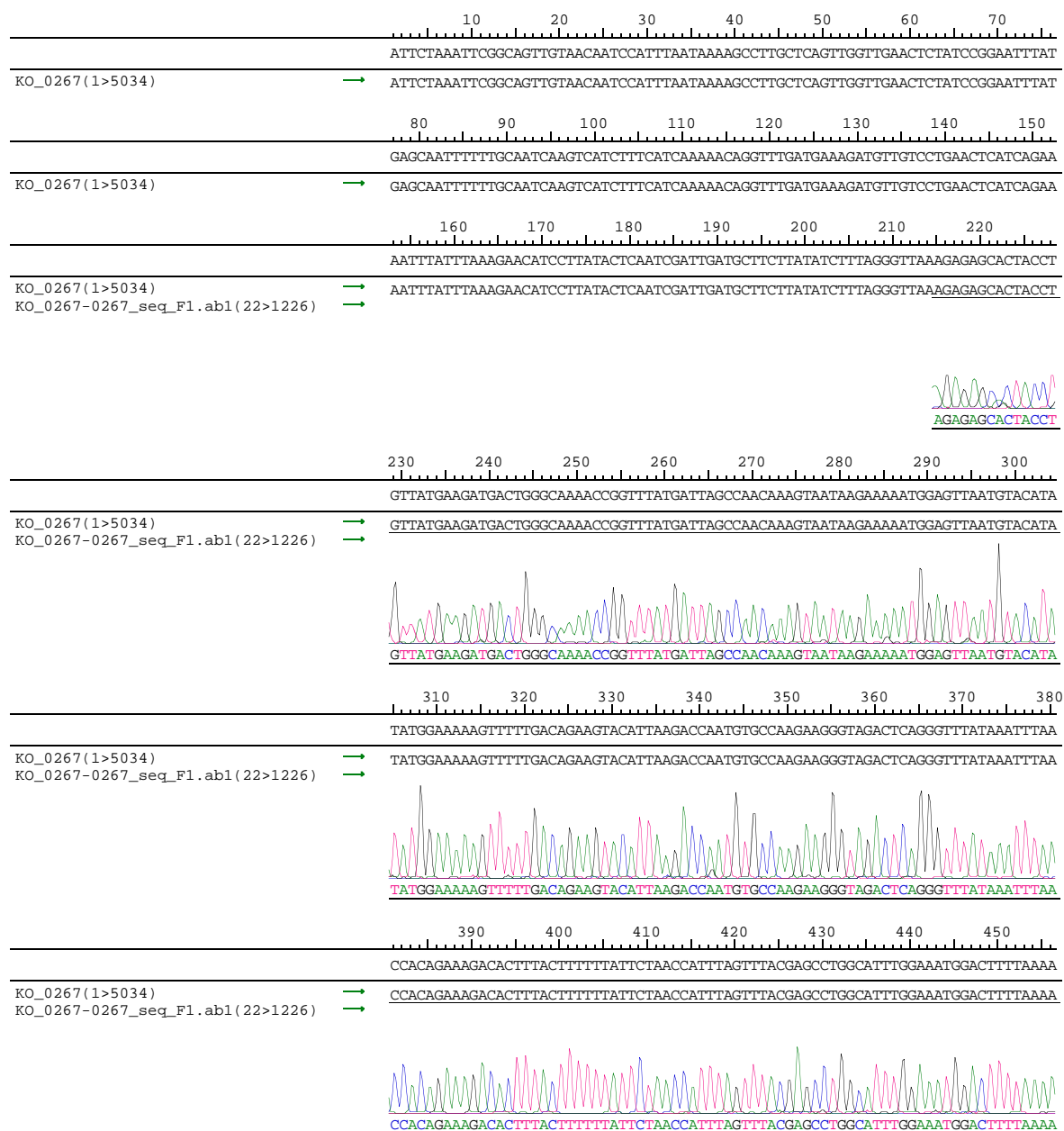
Page 10

2670
ATTGGAATTT
Konstrukt DotA-(1>2653) → ATTGGAATTT

8.6 Alignment der *lpc_0267*-Deletionsmutante

Montag, 21. Juli 2014 11:11
Project: Untitled Contig 1

Page 1

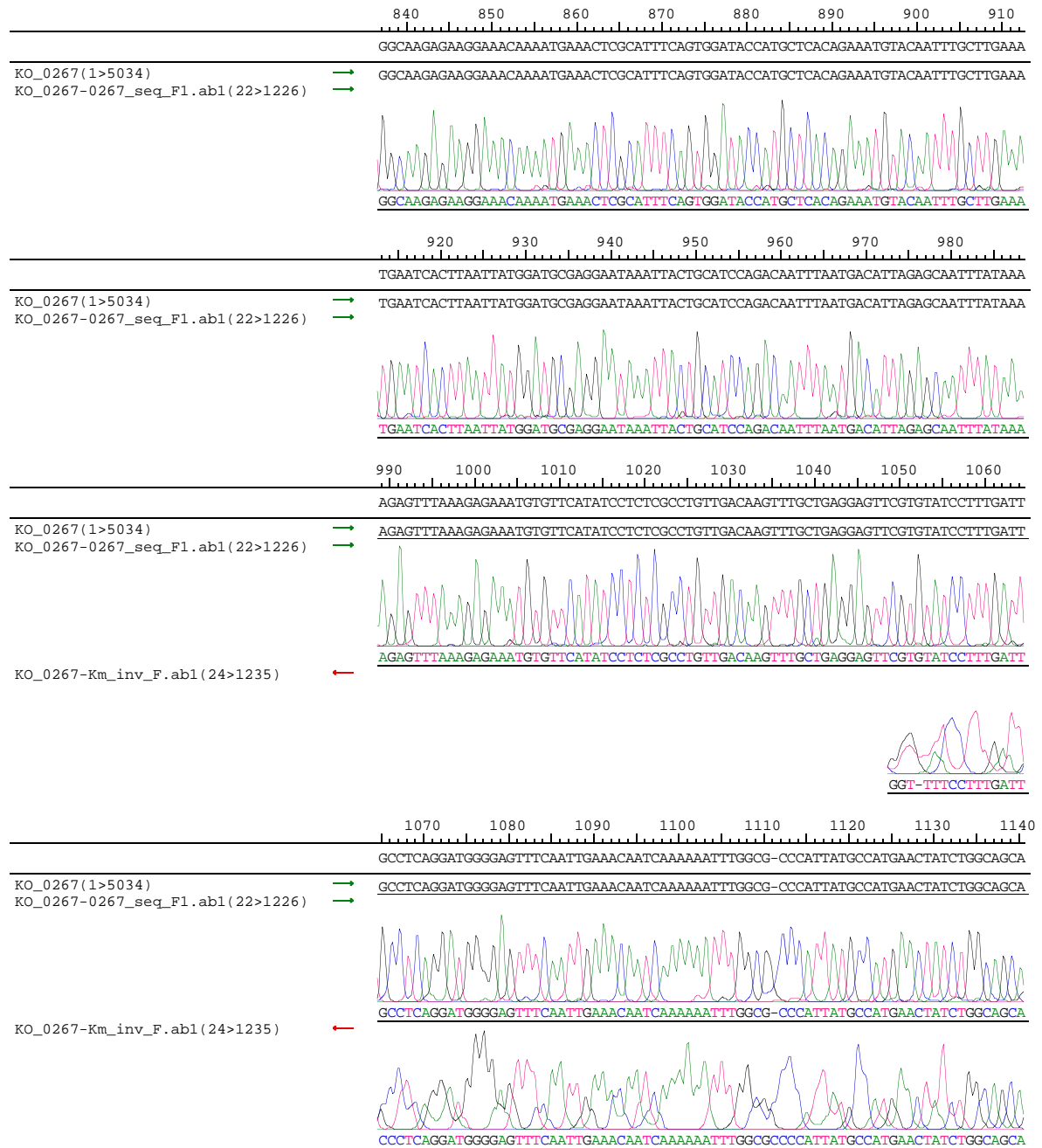


8 Anhang

Montag, 21. Juli 2014 11:11
Project: Untitled Contig 1

Page 2

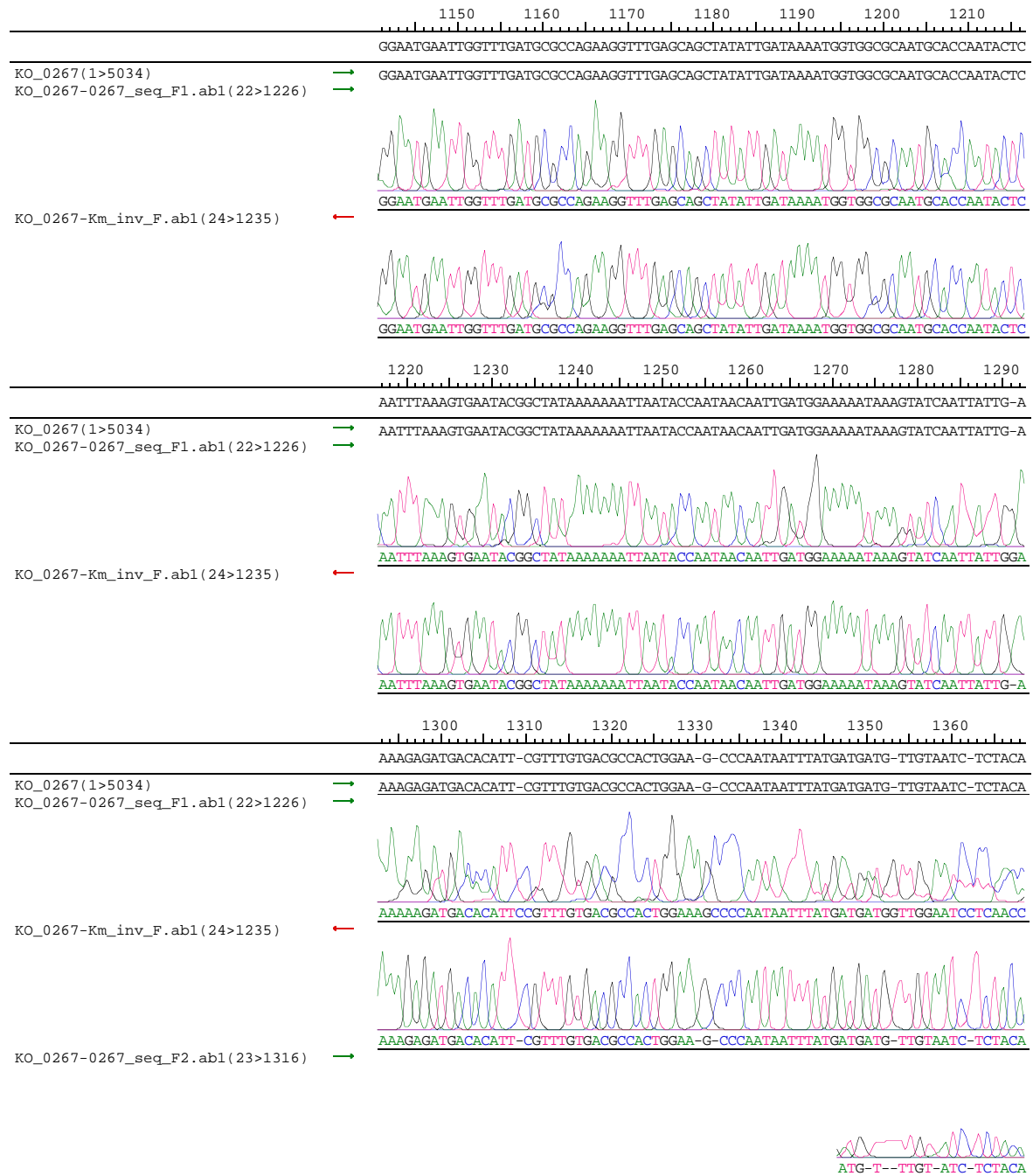


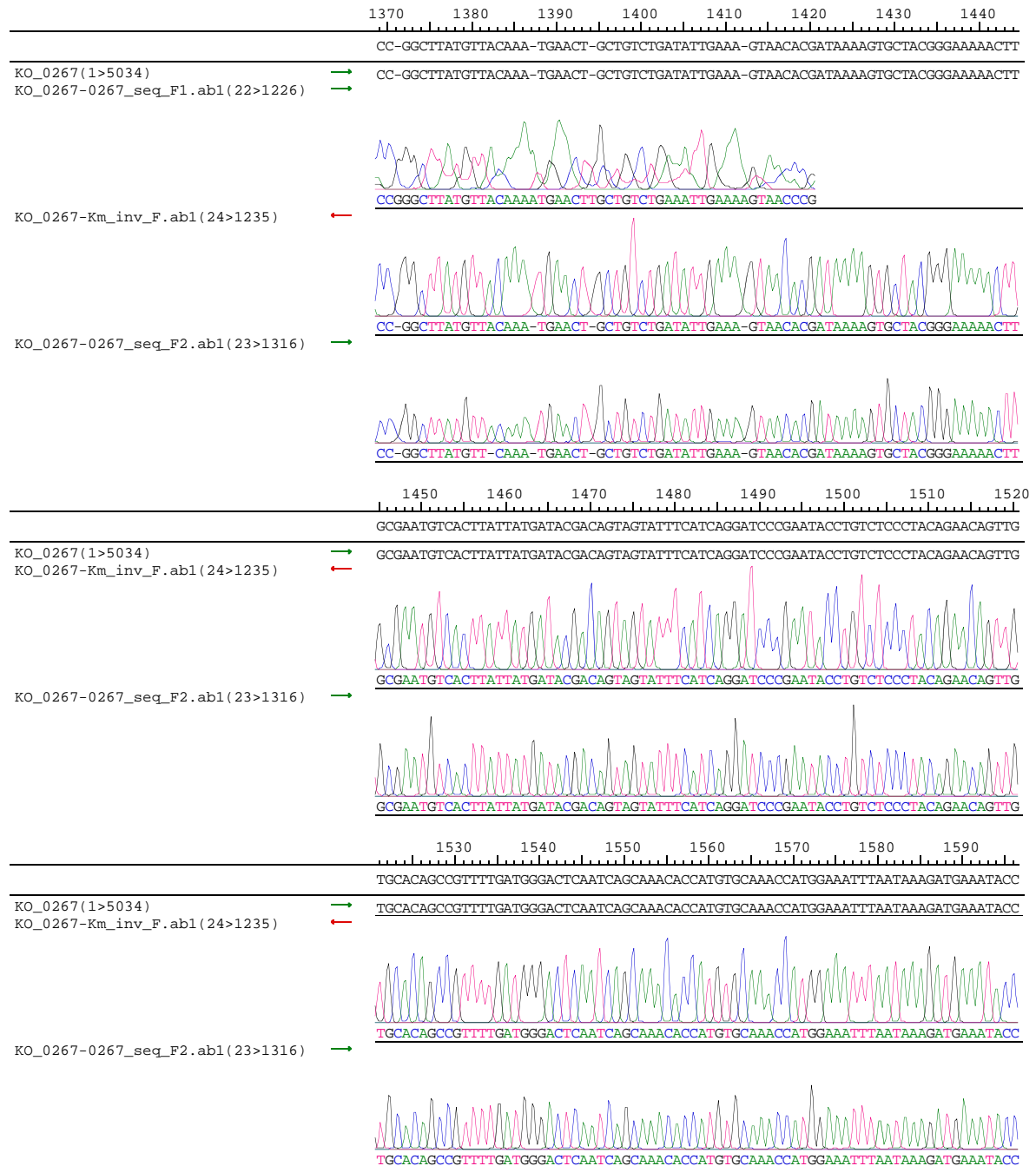


8 Anhang

Montag, 21. Juli 2014 11:11
Project: Untitled Contig 1

Page 4

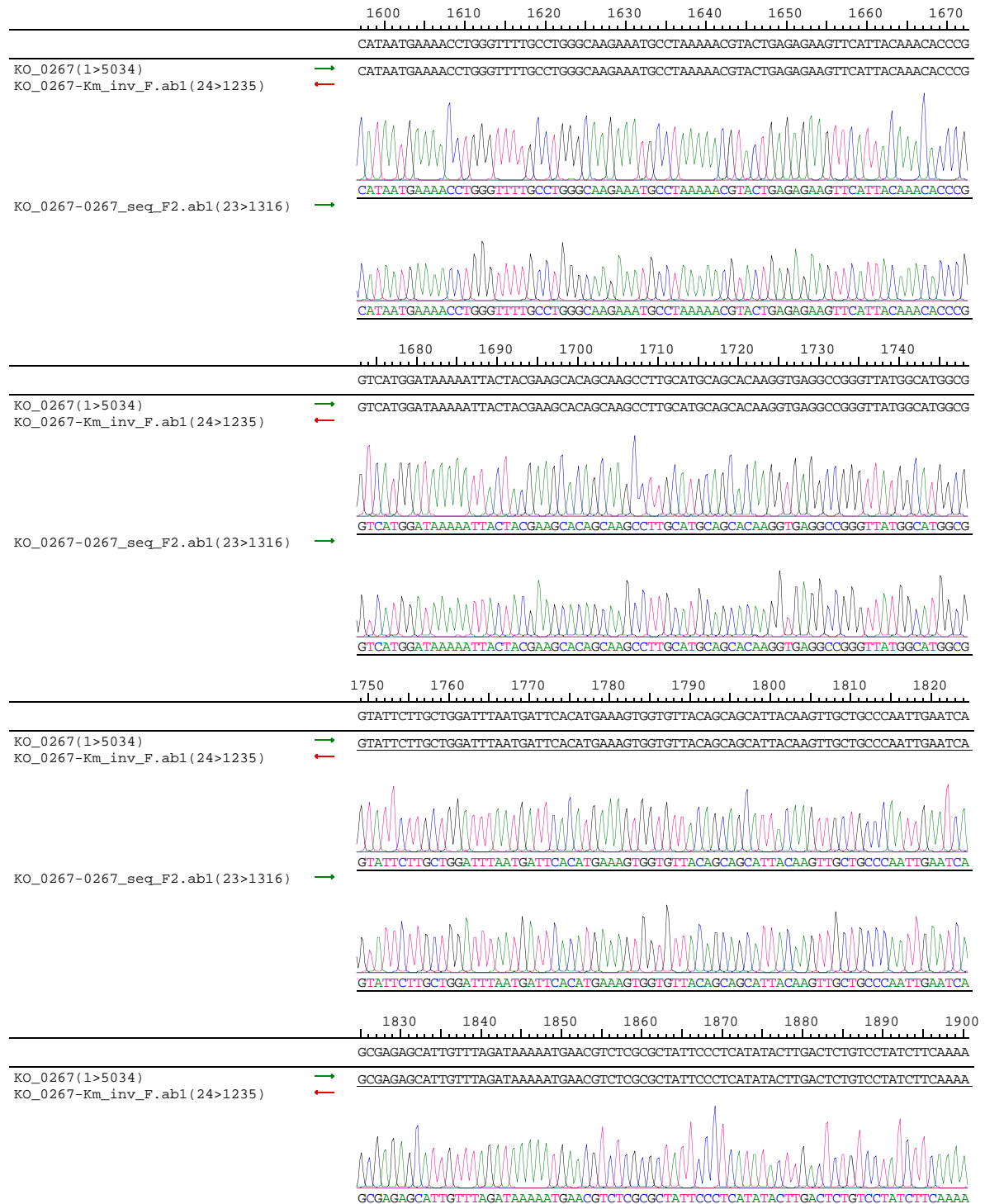




8 Anhang

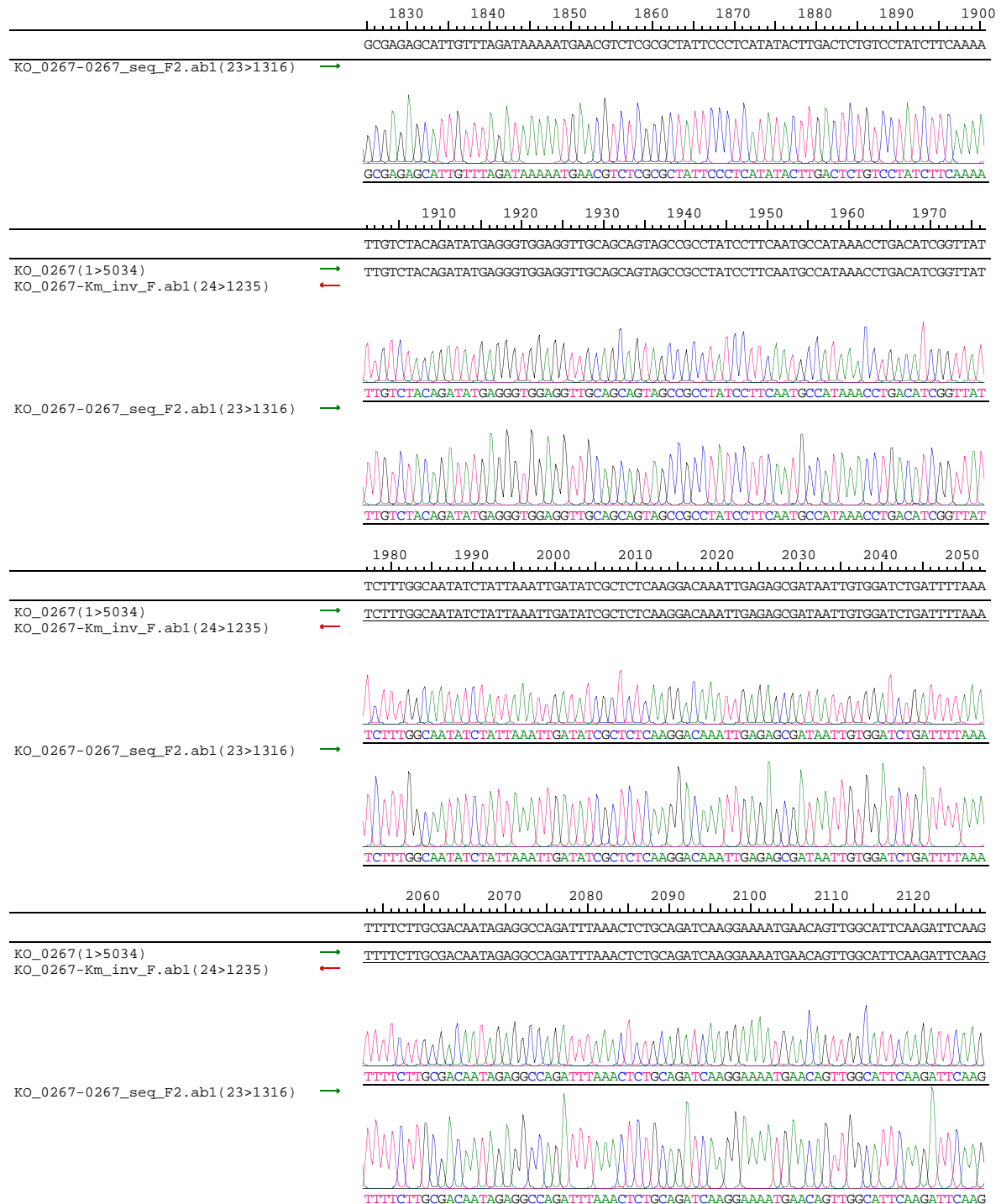
Montag, 21. Juli 2014 11:11
Project: Untitled Contig 1

Page 6



Montag, 21. Juli 2014 11:11
Project: Untitled Contig 1

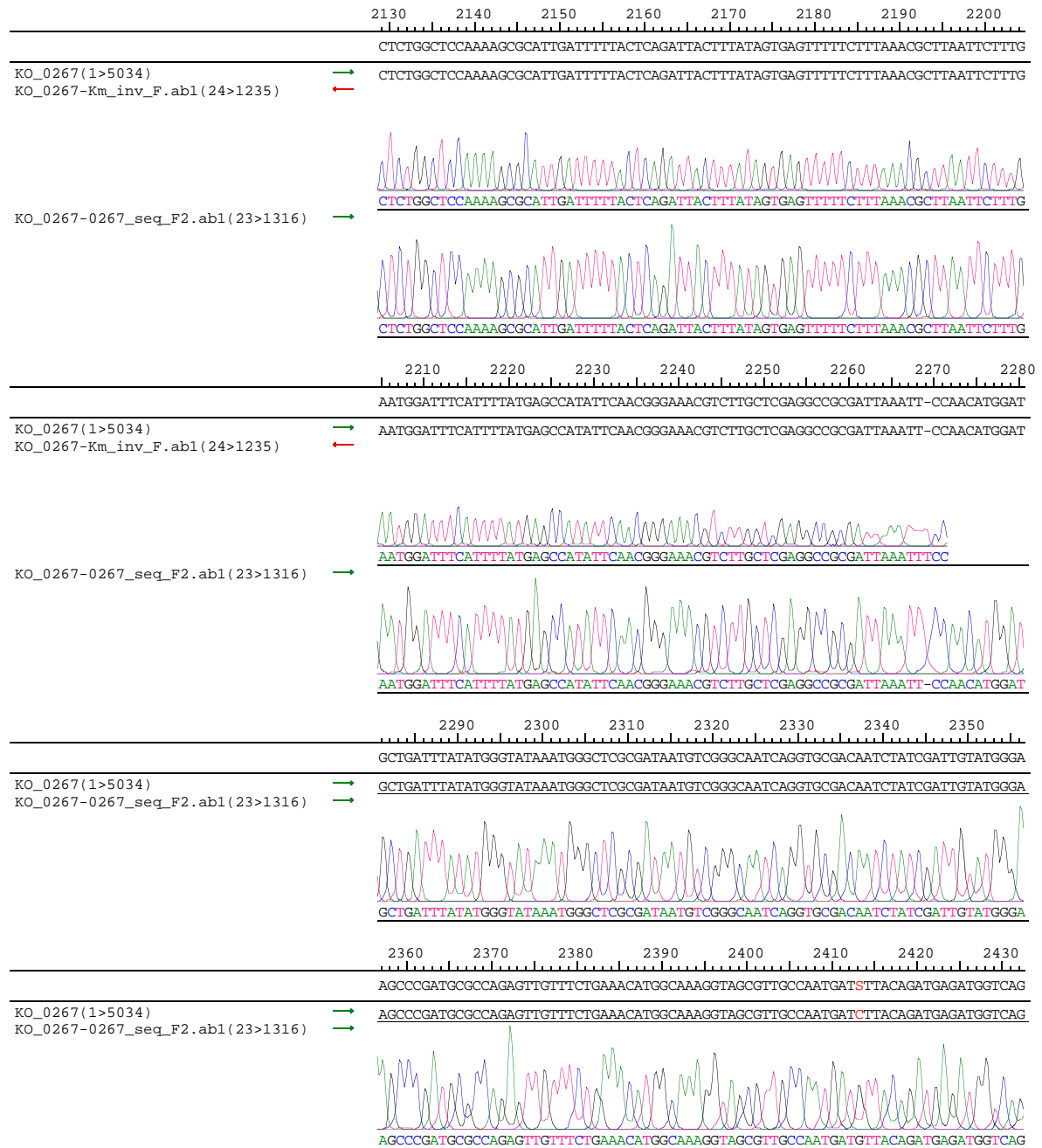
Page 7

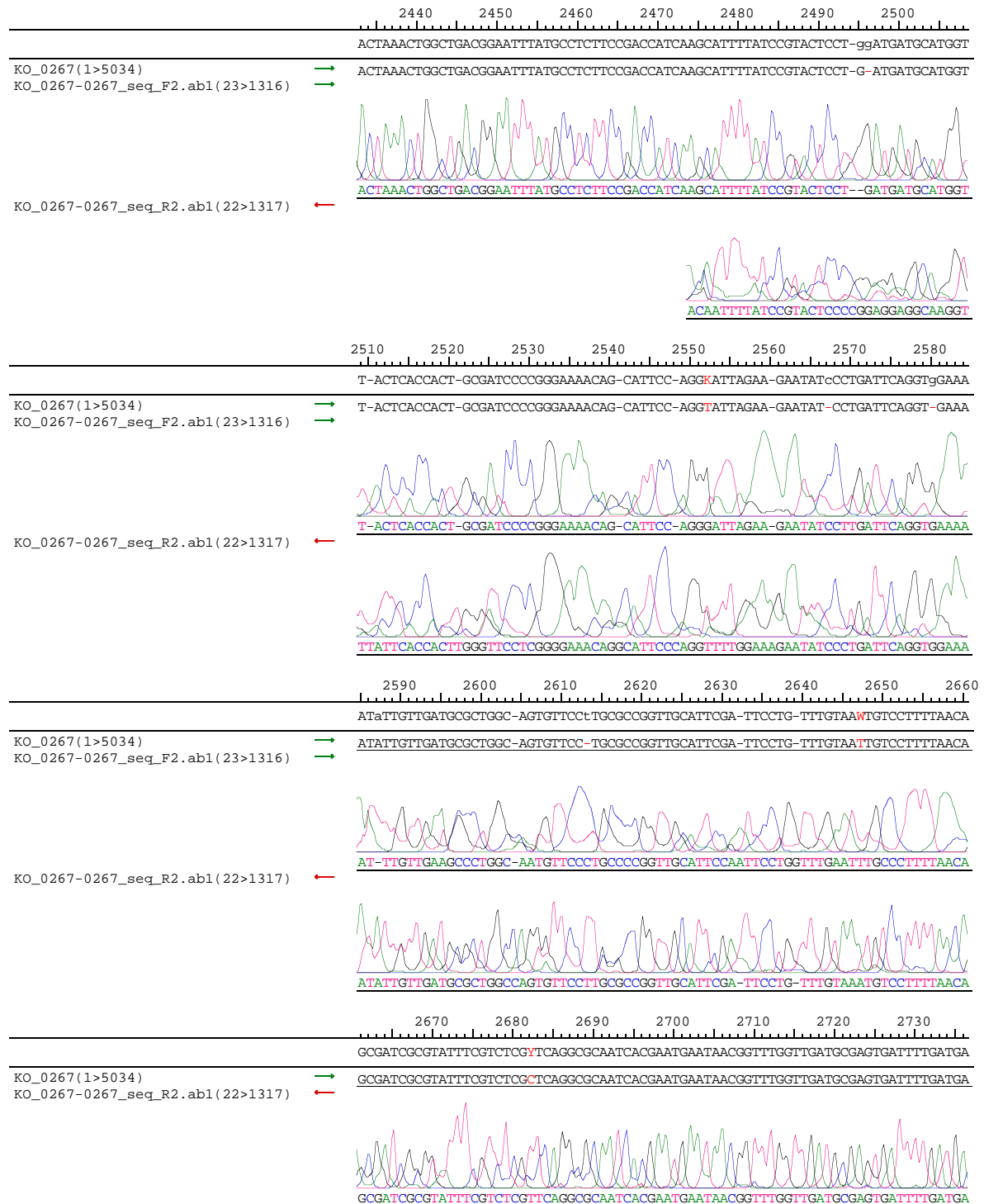


8 Anhang

Montag, 21. Juli 2014 11:11
Project: Untitled Contig 1

Page 8

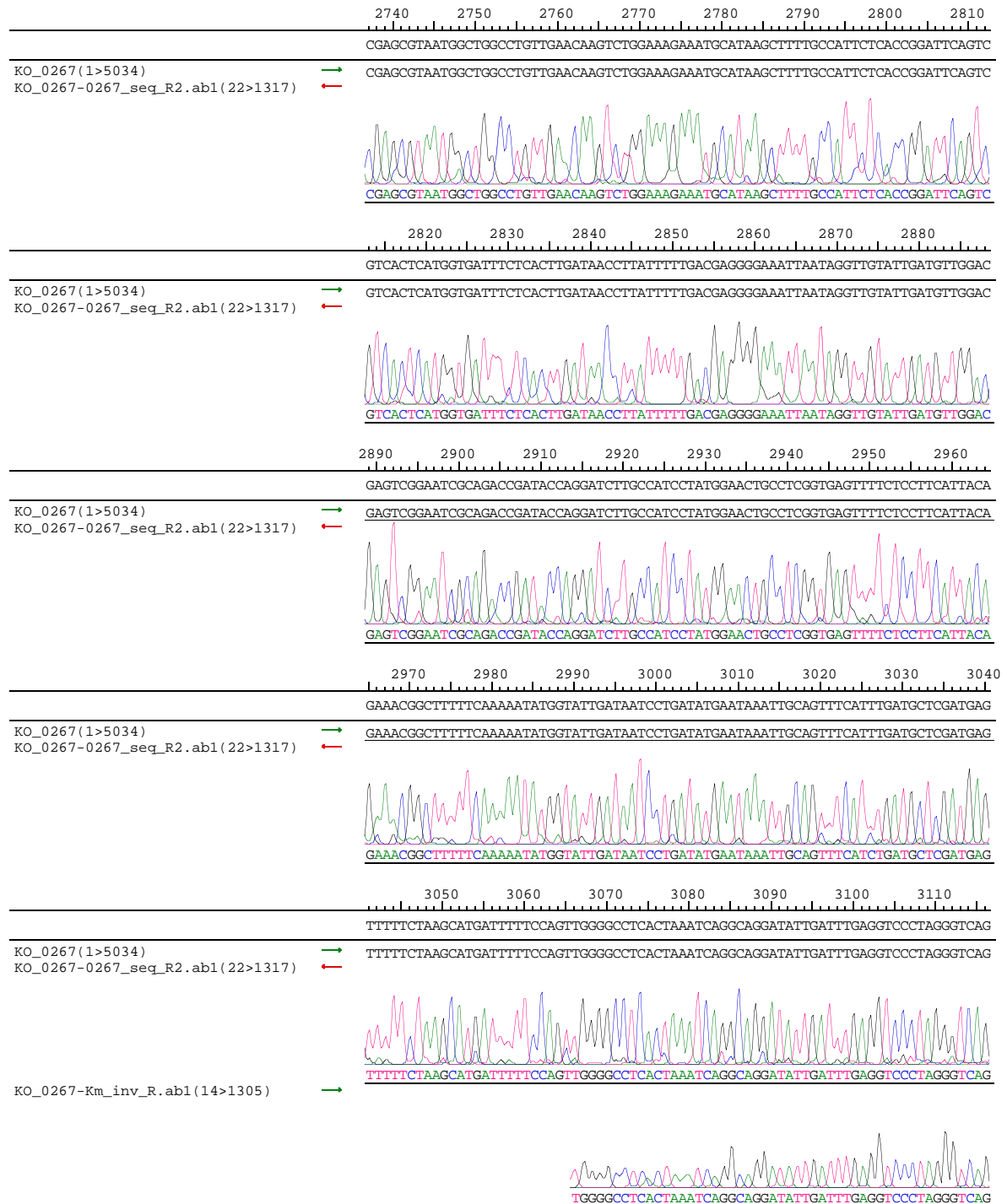




8 Anhang

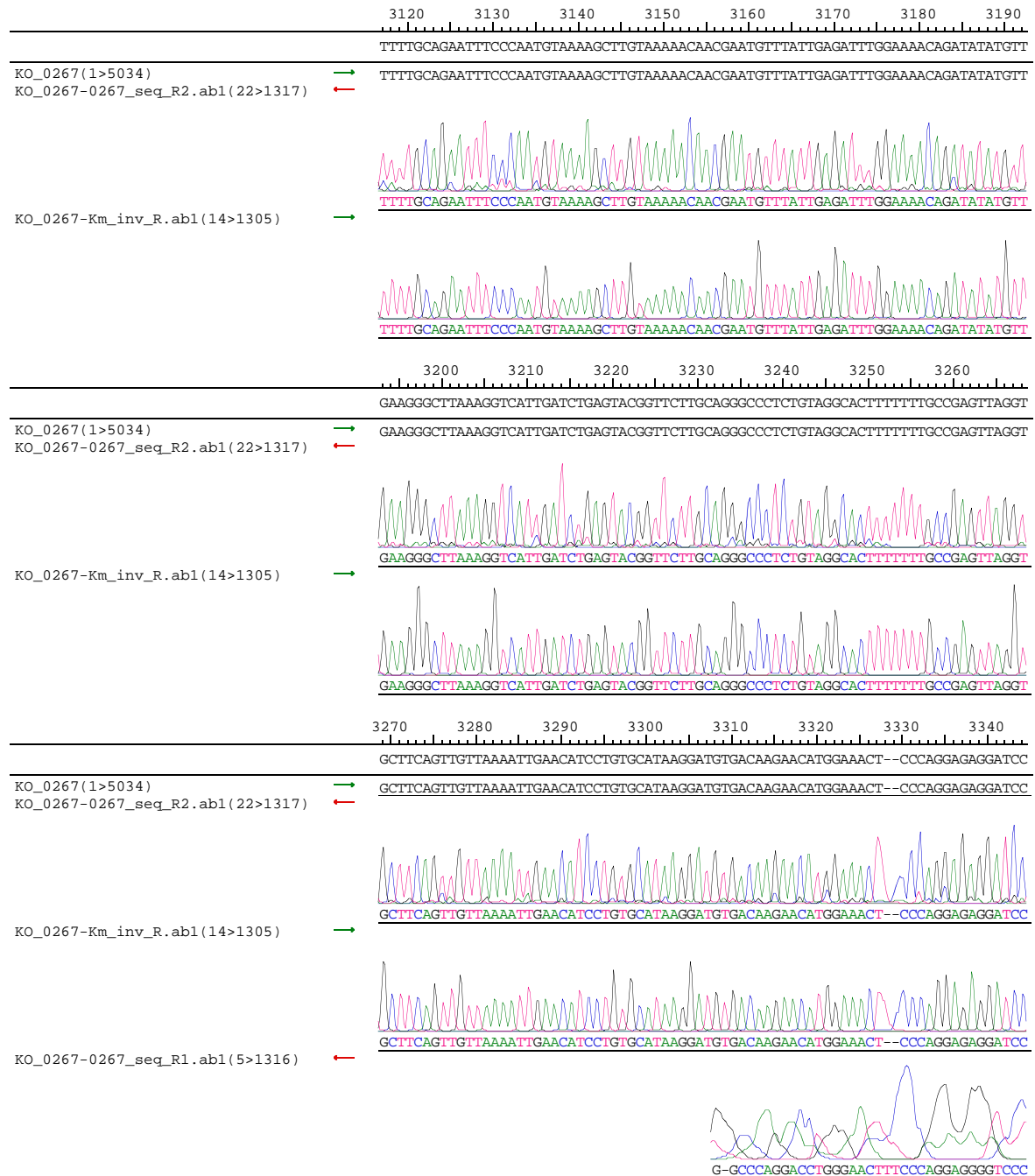
Montag, 21. Juli 2014 11:11
Project: Untitled Contig 1

Page 10



Montag, 21. Juli 2014 11:11
Project: Untitled Contig 1

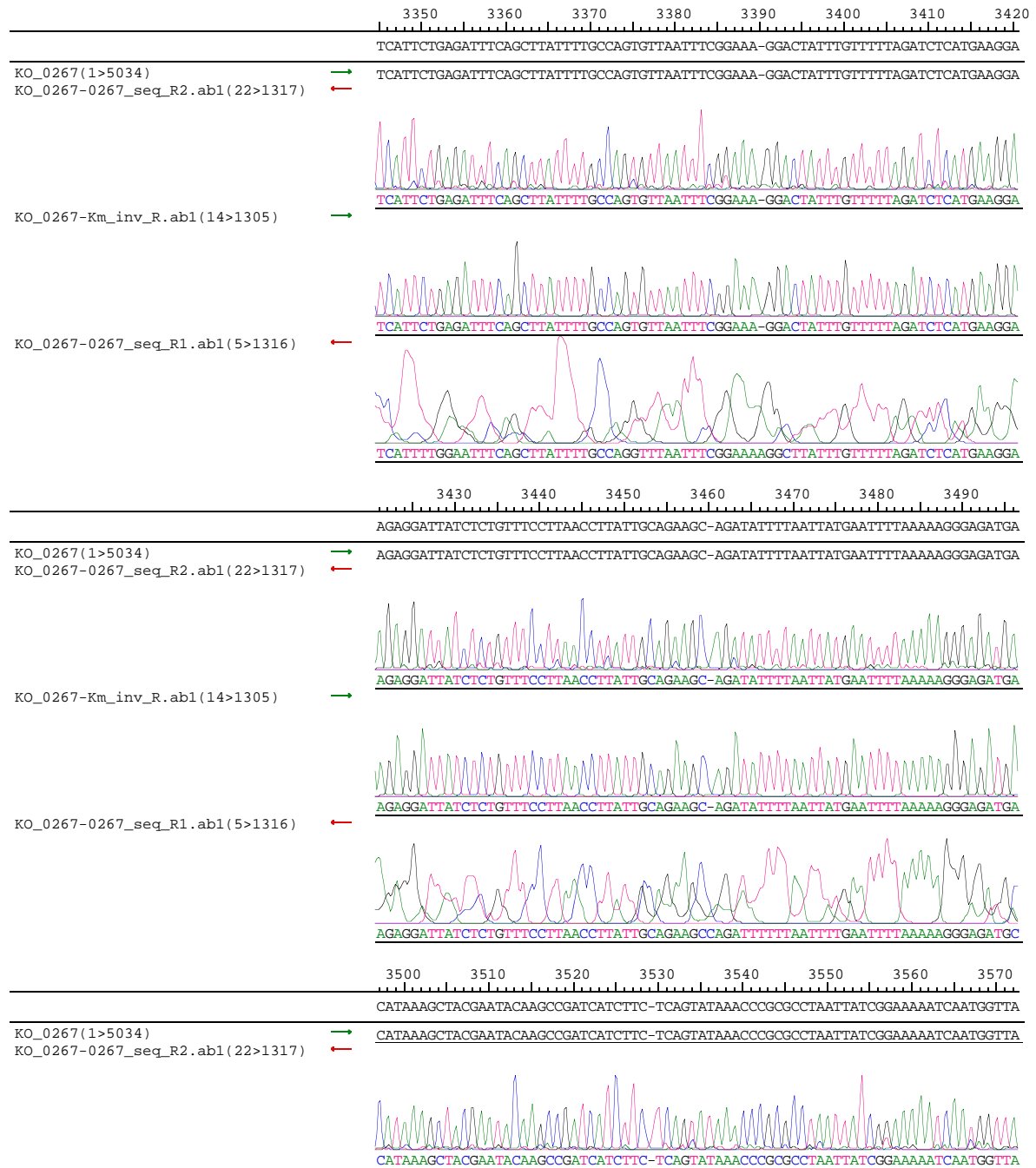
Page 11



8 Anhang

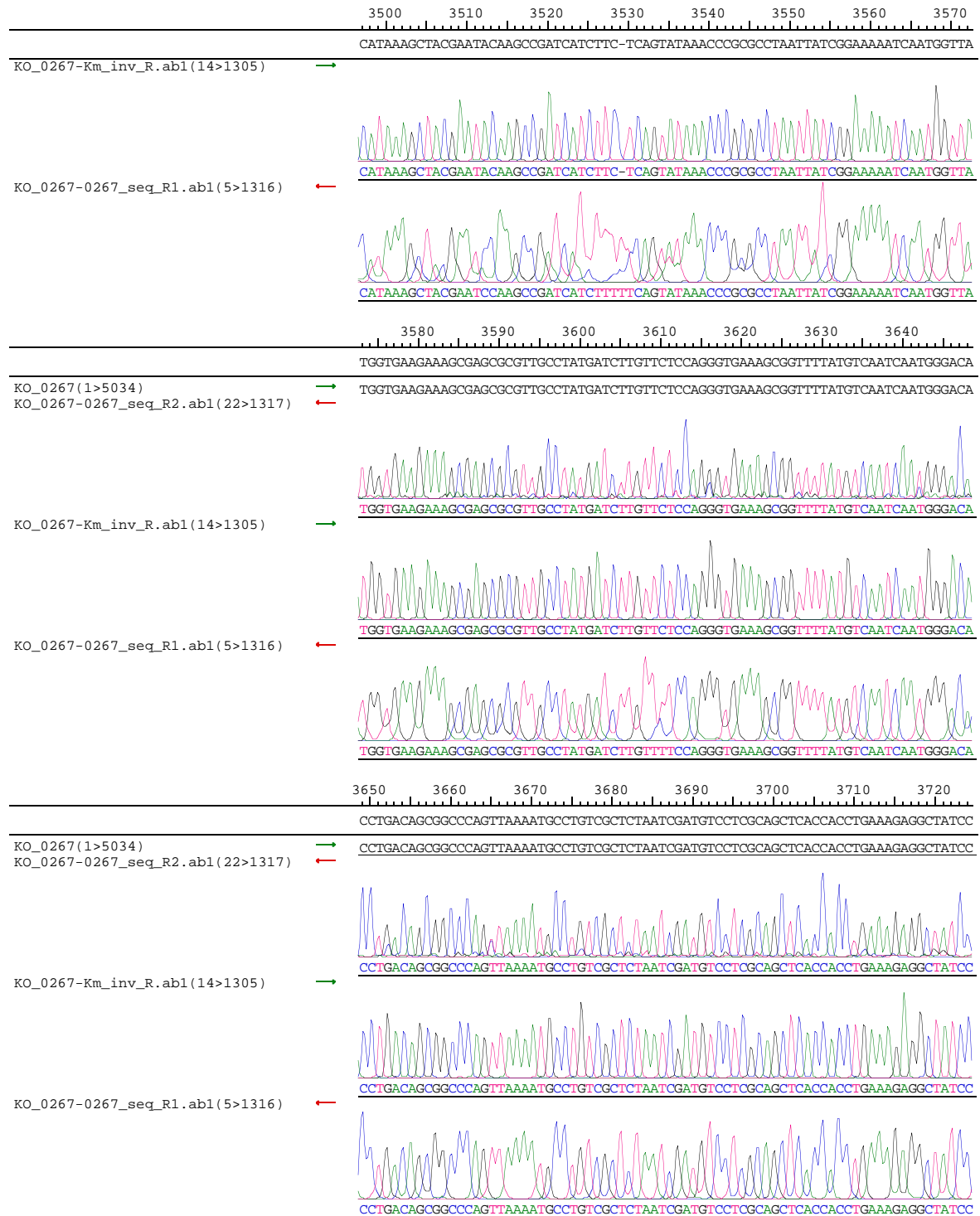
Montag, 21. Juli 2014 11:11
Project: Untitled Contig 1

Page 12



Montag, 21. Juli 2014 11:11
Project: Untitled Contig 1

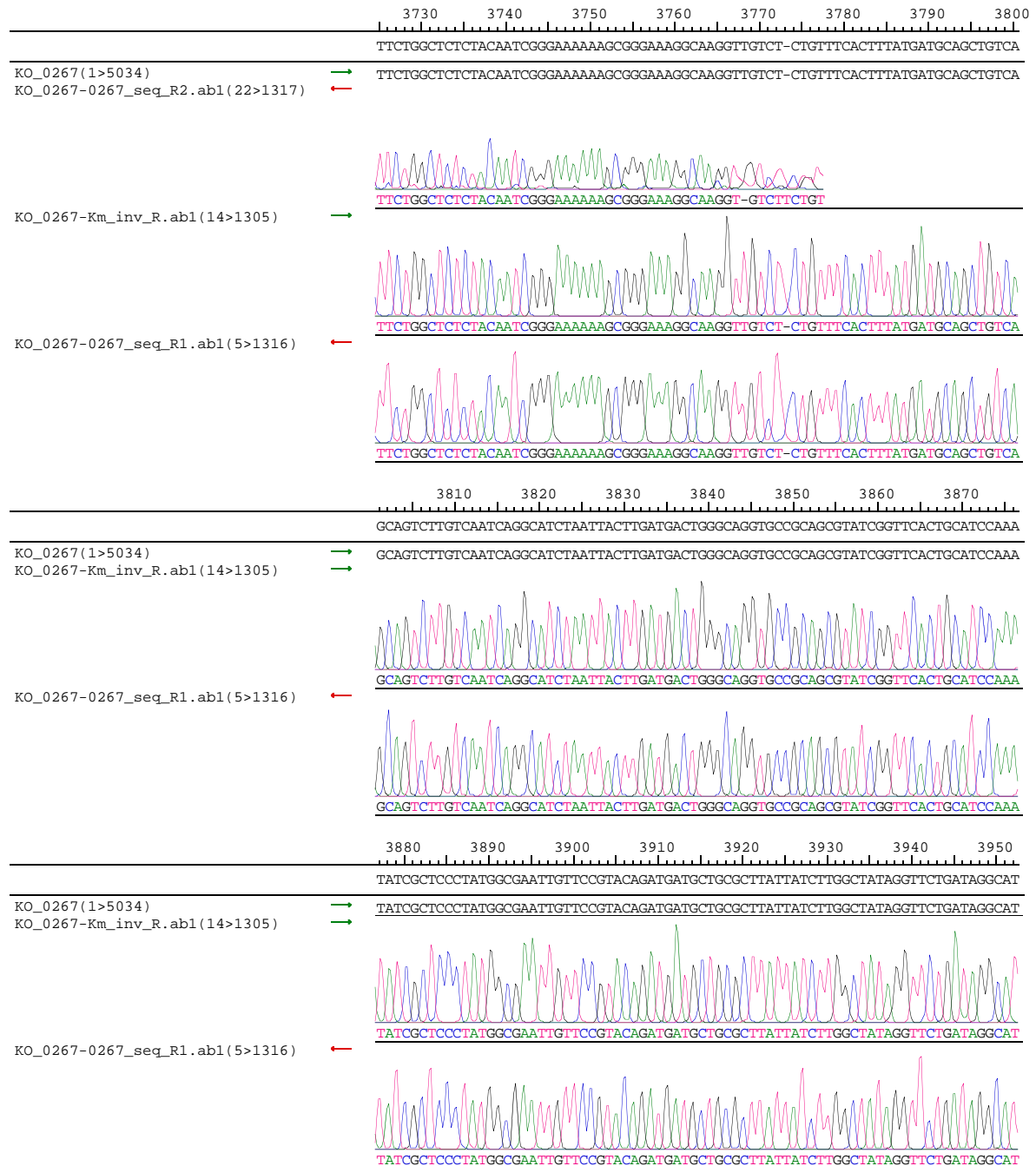
Page 13

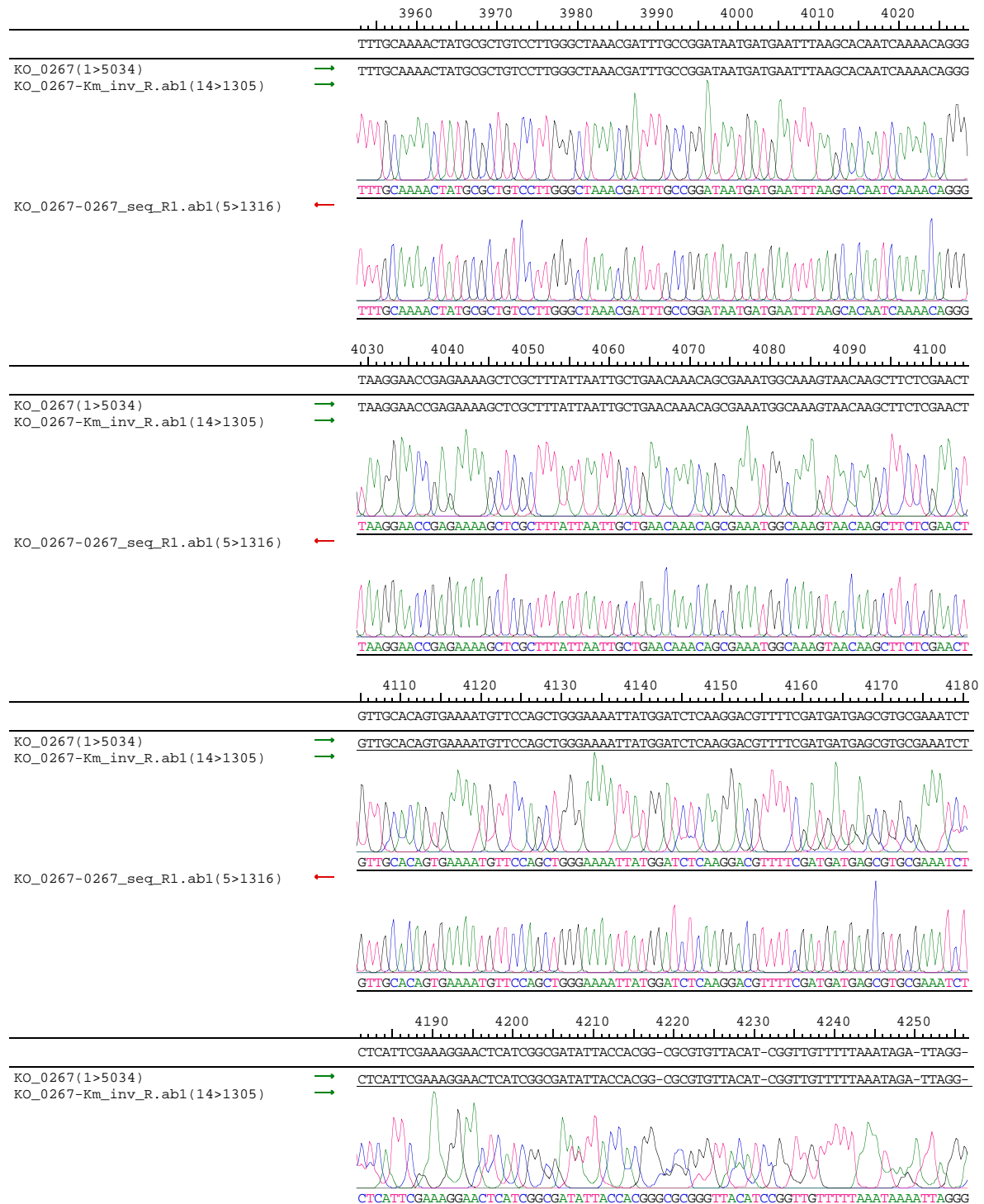


8 Anhang

Montag, 21. Juli 2014 11:11
Project: Untitled Contig 1

Page 14





8 Anhang

Montag, 21. Juli 2014 11:11
Project: Untitled Contig 1

Page 16



